

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Barbora Dvořáková**

**Mechanismus rytmického uvolňování ATP**

**Mechanism of rhythmical release of ATP**

*Bakalářská práce*

Vedoucí práce: **Ing. Irena Svobodová, Ph.D.**

Praha, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.7.2017

Barbora Dvořáková

## **Poděkování**

Ráda bych velmi poděkovala své školitelce, paní doktorce Ing. Ireně Svobodové Ph.D., za přínosné konzultace a podněty, které mi v mnohém pomohly při vypracování této bakalářské práce.

Velký dík patří také mé široké rodině za nepřestávající podporu z jejich strany.

## **Abstrakt**

Suprachiasmatické jádro hypotalamu je u savců centrem vnitřních hodin. Signální výstupy z této oblasti řídí cirkadiánní rytmicitu, které do značné míry podléhá fyziologie organismů od endokrinní sekrece až po chování. Na správné činnosti suprachiasmatického jádra se podílí aktivita jak neuronů, tak přítomných astrocytů. Oba tyto buněčné typy exprimují hodinové geny, které jsou molekulární podstatou cirkadiánní rytmicity. Mimo to v suprachiasmatickém jádře působí velká řada signálních molekul, díky kterým dochází k synchronizaci jednotlivých pacemakerů. V suprachiasmatickém jádře astrocyty periodicky uvolňují ATP a v průběhu cirkadiánního rytmu tak dochází k pravidelnému zvýšení hladiny ATP v extracelulárním prostoru. Velkou roli v procesu uvolňování ATP z astrocytů hraje intracelulární vápníková signalizace zahrnující změnu v koncentraci vápníku v cytoplazmě, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. Přestože se stále rozšiřují poznatky o působení ATP jako signální molekuly v nejrozličnějších oblastech fyziologie, význam fluktuací v suprachiasmatickém jádru není plně objasněn. Předpokládá se ovšem, že by se tento proces mohl podílet na koordinaci cirkadiánních oscilací. Objasnění tohoto mechanismu by mohlo pomoci k pochopení činnosti suprachiasmatického jádra, jež má klíčový vliv na řadu fyziologických procesů.

**Klíčová slova:** astrocyt, ATP, vápník, suprachiasmatické jádro, P2X a P2Y receptory

## **Abstract**

The suprachiasmatic nucleus of hypothalamus is a mammalian centre of an internal clock. The signal outputs from this brain area regulate circadian rhythmicity through the body which determines the physiological processes from endocrine secretion to behavior. Both neurons and astrocytes are participating in a proper activity of the suprachiasmatic nucleus by expressing the clock genes which ensure the molecular essence of circadian rhythmicity. Besides these two cell types the great scale of signal molecules provides the synchronizations of individual pacemakers. The astrocytes of the suprachiasmatic nucleus periodically release ATP so in particular phase of circadian rhythm there can be measured an increase of extracellular concentration of ATP. The considerable part in the mechanisms of ATP release is performed by calcium signaling which involves the changing of calcium concentrations in cytoplasm, endoplasmatic reticulum and mitochondria. The precise function of this process is not fully known although the knowledge of the effects of ATP as signal molecule is still broadening. However, it has been suggested that the fluctuations of extracellular ATP may be involved in coordinating of circadian oscillations. The clarification of this mechanism could shed light on how exactly the suprachiasmatic nucleus works which has a great impact on number of physiological processes.

**Key words:** astrocyte, ATP, calcium, suprachiasmatic nucleus, P2X and P2Y receptors

## Seznam zkratek

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub></b>	extracelulární koncentrace vápníku	<b>CRE element</b>	DNA sekvence vazající CREB (angl. cAMP response element-binding protein)
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	intracelulární koncentrace vápníku	<b>CRY</b>	protein Cryptochrom
<b>AA-NAT</b>	aralkylamin N-acetyltransferáza	<b>Cry</b>	gen proteinu CRY
<b>ABC</b>	ATP vazající kaseta (angl. ATP binding cassette)	<b>DAG</b>	1,2-diacylglycerol
<b>ADP</b>	adenosindifosfát	<b>dnSNARE</b>	SNARE s dominantní mutací v proteinu synaptobrevin II (angl. dominant-negative SNARE)
<b>ACh</b>	acetylcholin	<b>EAAT</b>	transportér pro glutamát (angl. Excitatory Amino Acid Transporter)
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát	<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>AMPA receptor</b>	glutamátový receptor, jehož agonistou je kyselina $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová	<b>GABA</b>	kyselina $\gamma$ -aminomáselná (angl. Gamma-AminoButyric Acid)
<b>ASMT</b>	acetylserotoninmethyltransferáza	<b>GABAA</b>	receptor pro GABA typu A
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát	<b>GAT1 a GAT3</b>	transportér pro GABA typu 1 a 3
<b>AVP</b>	arginin vasopresin	<b>Gd<sup>3+</sup></b>	trojmocné kationty gadolinia
<b>Avp</b>	gen pro arginin vasopresin	<b>GFAP</b>	gliový fibrilární acidický protein (angl. Glial fibrillary acidic protein)
<b>BMAL1</b>	protein hodinového genu Bmal1 (angl. Brain and Muscle Aryl hydrocyrbon receptor nuclear translocator-Like protein)	<b>GLAST</b>	transportér pro glutamát a aspartát (angl. Glutamate Aspartate Transporter)
<b>Bmal1</b>	hodinový gen kódující protein BMAL1	<b>GLT-1</b>	glutamátový transportér (angl. glutamate transporter 1)
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	vápenaté kationty	<b>GRP</b>	gastrin uvolňující peptid (angl. Gastrin-Releasing Peptide)
<b>CFTR</b>	typ ABC proteinu (angl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	<b>Grp</b>	gen pro gastrin uvolňující peptid (angl. Gastrin-Releasing Peptide)
<b>CGRP</b>	neurotransmitter z rodiny proteinů příbuzných kalcitoninu (angl. Calcitonin Gene-Related Peptide)	<b>IMM</b>	vnitřní mitochondriální membrána (angl. Inner Mitochondrial Membrane)
<b>CLOCK</b>	protein hodinového genu (angl. Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)	<b>IP3</b>	inositol-1,4,5-trifosfát
<b>Clock</b>	hodinový protein (angl. Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)	<b>IP3Rs</b>	inositol-1,4,5-trifosfátové receptory
		<b>K<sup>+</sup></b>	draslíkové kationty

<b>LDP</b>	dlouhodobá deprese (angl. Long Terminal Depression)	<b>PDF</b>	pigment rozptylující faktor (angl. Pigment Dispersing Factor)
<b>LTP</b>	dlouhodobá potenciace (angl. Long Terminal Potentiation)	<b>PER</b>	protein Period
<b>MCU</b>	mitochondriální $\text{Ca}^{2+}$ uniporter (angl. Mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ uniporter)	<b>Per</b>	hodinový gen proteinu PER
<b>MDR1</b>	typ ABC proteinu (angl. Multi-drug Resistance)	<b>PIP2</b>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
<b>mGlutR3 a mGlutR5</b>	metanotropní receptor pro glutamát typu 3 a 5	<b>PKC</b>	fosfolipáza C
<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina (angl. Messenger Ribonucleic Acid)	<b>PM</b>	plazmatická membrána
<b>MT1, MT2, Mel1C</b>	receptory pro melatonin typu A, B a C	<b>Ru360</b>	ruthenium 360
<b>NA</b>	noradrenalin	<b>SCN</b>	suprachiasmatické jádro
<b><math>\text{Na}^+</math></b>	sodné kationty	<b>SERCA</b>	membránová ATPázová ER pumpa (angl. Smooth Endoplasmic Reticular $\text{Ca}^{2+}$ ATPase)
<b>NAS</b>	N-acetylserotonin	<b>SNAP-23</b>	jeden z proteinů SNARE komplexu (angl. Soluble NSF Attachment Protein)
<b>NCLX</b>	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník	<b>SNARE</b>	protein vezikulárního transportu (angl. SNAP Receptor)
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-asparagová kyselina	<b>SOCs</b>	kanály ovládané ER (angl. Store-Operated Channels)
<b>NMS</b>	neuromedin S	<b>TNF <math>\alpha</math></b>	faktor nádorové nekrózy alfa (angl. Tumor Necrosis Faktor Alpha)
<b>NO</b>	oxid dusnatý	<b>TRP kanály</b>	iontové kanály propustné pro $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (angl. Transient Receptor Potential)
<b>non-NMDA receptor</b>	receptor pro glutamát, jehož agonistou není N-methyl-D-asparagová kyselina	<b>TTFL</b>	negativní zpětnovazebná smyčka proteinů a jejich genů (angl. Transcriptional/postranslational negative feedback)
<b>NPAS1</b>	hodinový gen (angl. Neuronal PAS domain protein 1)	<b>UDP</b>	uridindifosfát
<b>NPY</b>	neuropeptid Y	<b>UTP</b>	uridintrifosfát
<b>NR2C</b>	podjednotka glutamátového receptoru NMDA	<b>VDAC</b>	napětově závislý aniontový kanál (angl. Voltage-dependent anion channel)
<b>NREM</b>	non-REM spánek (angl. Non-rapid eye movement)	<b>VIP</b>	vasoaktivní střevní peptid (angl. Vasoactive Intestinal Peptide)
<b>P2X<sub>1-7</sub></b>	ionotropní purinergní receptory typu 1-7	<b>Vip</b>	gen pro vasoaktivní střevní peptid (angl. Vasoactive Intestinal Peptide)
<b>P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub></b>	metabotropní purinergní receptory typu 1,2,4,6,11-14		
<b>PAR-1</b>	membránový receptor aktivovaný proteinázou typu 1 (angl. Proteinase-activated receptor 1)		

**VNUT-1**

vezikulární transportér pro  
nukleotidy (angl. Vesicular  
Nucleotide Transporter)

**VSOR  
chloridové  
kanály**

usměrňující chloridové kanály  
citlivé na změnu objemu (angl.  
Volume-sensitive outwardly  
rectifying)



# Obsah

<b>ÚVOD .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>CIRKADIÁNNÍ RYTMY .....</b>	<b>- 2 -</b>
CHARAKTERISTIKA SCN .....	- 2 -
HODINOVÉ GENY .....	- 3 -
RYTMICITA .....	- 5 -
EPIFÝZA A MELATONIN .....	- 6 -
Vztah mezi melatoninem a SCN .....	- 6 -
<b>ATP JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA.....</b>	<b>- 7 -</b>
PURINERGNÍ RECEPTORY .....	- 8 -
PURINERGNÍ SIGNALIZACE .....	- 9 -
<b>ASTROCYTY .....</b>	<b>- 11 -</b>
CHARAKTERISTIKA ASTROCYTŮ .....	- 11 -
FUNKCE ASTROCYTŮ .....	- 11 -
VÁPŇÍKOVÉ VLNY .....	- 12 -
GLIOTRANSMITERY .....	- 16 -
ATP v interakci mezi astrocyty a neurony .....	- 18 -
Mechanismy vylučování ATP z buňky .....	- 19 -
Faktory ovlivňující aktivaci astrocytů a vylučování ATP .....	- 21 -
ROLE ASTROCYTŮ V SCN .....	- 22 -
<b>RYTMICKÉ UVOLŇOVÁNÍ ATP Z ASTROCYTŮ .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>REFERENCE .....</b>	<b>- 27 -</b>

## ÚVOD

Cirkadiánní rytmy jsou jedním ze základních regulačních faktorů podílejících se na řízení fyziologických funkcí u všech organismů. Každý živý jedinec je schopen se adaptovat na periodické změny vnějšího prostředí díky systému vnitřních hodin udávající cirkadiánní rytmicitu všem tělním buňkám. U savců je hlavní centrum vnitřních hodin lokalizováno v suprachiasmatickém jádře hypotalamu, které je umístěno nad křížením optických nervů a prostřednictvím synaptických kontaktů spojeno se sítnicí.

Suprachiasmatické jádro je složeno krom neurální sítě i početnou populací astrocytů. Oba tyto buněčné typy exprimují hodinové geny, klíčové komponenty vnitřních hodin, a jako rovnocenní partneři formují celkový charakter výstupních signálů suprachiasmatického jádra. Mechanismus stojící za těmito modulačními procesy není plně objasněn, ovšem je jasné, že nezbytným předpokladem je reciproční komunikace mezi neurony a astrocyty, která je zprostředkovávána škálou signálních molekul.

Cílem této práce je shrnutí poznatků o tom, do jaké míry se na fyziologických procesech suprachiasmatického jádra podílí působení extracelulárního ATP, jehož koncentrace se v průběhu cirkadiánního cyklu pravidelně zvyšuje. ATP je vysokoenergetická a v živých organismech hojně zastoupená molekula, jejíž štěpící reakce za vzniku ADP a fosfátu dodává potřebnou energii pro pohon většiny endergonických reakcí v živých systémech. Krom toho ovšem působí ATP prostřednictvím svých purinergních receptorů jako regulační molekula na velké množství různých buněk. ATP je vedle glutamátu a D-serinu jedna z předních signálních molekul vylučovaných astrocyty, gliotransmitterů, která je schopna ovlivňovat aktivitu neuronů, na které se váže.

Tato bakalářská práce začíná popisem systému vnitřních hodin od molekulárních mechanismů hodinových genů až po strukturu suprachiasmatického jádra. Následně se text zaměřuje na oblast purinergní signalizace, ve které jsou popsány receptory vázající ATP a také oblasti, ve kterých ATP působí jako signální molekula. Další část pak popisuje astrocyty jako klíčový buněčný typ suprachiasmatického jádra a zaměřuje se na ATP z pohledu gliotransmiteru, tedy za jakých podmínek a jak dochází k jeho vylučování do vnějšího okolí těchto glií. Poslední část vše uzavírá shrnutím poznatků ohledně mechanismu odpovědného za pravidelné vylučování ATP do extracelulárního prostoru a také možné role ATP jako gliotransmiteru na řízení fyziologických procesů SCN.

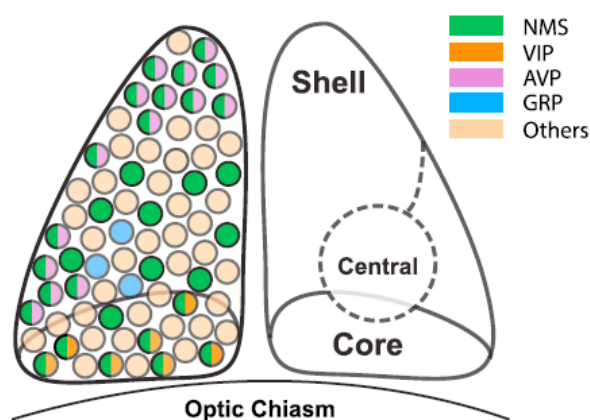
## Cirkadiánní rytmy

Cirkadiánní rytmy jsou vrozené biorytmy produkované tzv. vnitřními hodinami, systémem, který je nezbytný pro správnou koordinaci vnějšího prostředí s prostředím samotného organismu. Jsou k nalezení v rámci celé živočišné říše, včetně prokaryotických organismů (Hung, L.-M., and Chen T.-H., 2003) a umožňují svému nositeli v předstihu reagovat na periodické změny okolí. Jako hlavní řídicí centrum schopné udávat rytmus buňkám v rámci celého těla působí u savců suprachiasmatické jádro (SCN). Při experimentálním odstranění SCN se zvířata stávají arytmitickými (v lokomoční aktivitě, endokrinních, biochemických a fyziologických procesech) a při transplantaci SCN se u nich cirkadiánní rytmy obnovují, ovšem s periodou donora tkáně (Chi-Castañeda and Ortega, 2016). Výstupní signály z SCN, jak humorální, tak neurální, jsou předávány do mnoha tkání a řídí tak celou řadu dalších procesů od správně načasovaného uvolňování hormonů, fluktuací tělní teploty až po behaviorální rytmy (Takahashi et al., 2008).

## Charakteristika SCN

SCN je párová struktura v anteroventrální části hypotalamu umístěná přímo nad křížením optických nervů (lat. *chiasma opticum*) a po obou stranách třetí mozkové komory. Je to heterogenní struktura tvořena sítí desetitisíců, především GABAergně propojených (Strecker et al., 1997), neuronů a velkým počtem gliových buněk astrocytů (Morin et al., 1989).

SCN lze rozdělit na dva oddíly, dorzální (angl. *shell*) exprimující neuropeptid arginin vasopresin (AVP) a ventrální (angl. *core*) exprimující vasoaktivní intestinální peptid (VIP). Krom toho lze popsat ještě centrální zónu s expresí GRP, ke které ovšem dochází částečně i v *core* (Lee et al., 2015). Právě neurony dorzálního SCN jsou pravděpodobně ony pacemakerové buňky udávající svou vnitřní periodicitou rytmické chování organismu (Herzog et al., 2017). Ventrální SCN je prostřednictvím glutamátových



Obr. 1: **Schéma SCN.** *Core* je představováno neurony exprimující VIP, *shell* naopak AVP neurony. V centrální oblasti jsou přítomny neurony produkující GRP. Krom těchto peptidů jsou v rámci celého SCN zastoupeny ještě další peptidy včetně NMS. (Upraveno dle Lee et al., 2015)

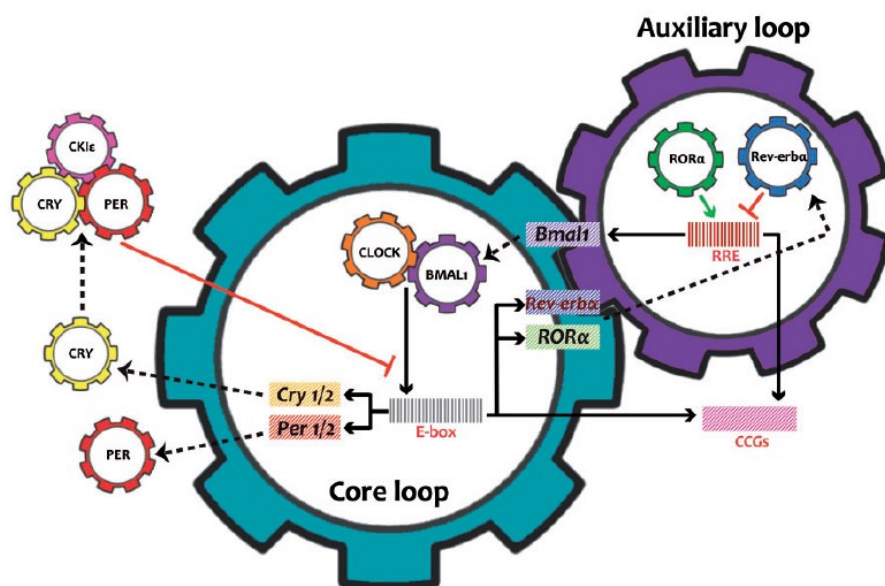
synapsí propojeno se sítnicí, z něj pak vede hustá informační síť GABAerních neuronů předávající signály dorzálnímu SCN (Albus et al., 2005). Tím je zajištěna funkční dráha poskytující hypotalamu informace v podobě světelných impulzů, na jejichž základě je možná modulace, nastavení periody a fáze, cirkadiánního rytmu (Moore, 1997) a tedy synchronizace vnitřních hodin s vnějším světelným cyklem. Ventrální SCN svou aktivitou moduluje dorzální SCN, *shell* přijímá vstupní signály od VIP neuronů, obráceně to však neplatí (Brancaccio et al., 2014). Při chirurgickém oddělení *core* a *shell* dochází k prodloužení periody do podoby, kterou dorzální neurony bez vlivu VIP neuronů normálně exprimují (Mieda et al., 2016).

## Hodinové geny

Celá vnitřní rytmicita oscilujících buněk podléhá expresi několika genů, souborně nazývaných jako hodinové geny (angl. *clock genes*). K jejich transkripci nedochází pouze u neuronů, ale také u přítomných astrocytů (Prolo, 2005) a pro správnou rytmickou aktivitu SCN jsou nezbytné hodinové geny u obou těchto typů buněk (Brancaccio et al., 2017).

Hodinové geny jsou vzájemně regulovány na základě zpětnovazebných interakcí prostřednictvím vlastních proteinů, proces se označuje jako TTFL (z angl. *transcriptional/postranslational negative feedback*), výsledkem je perioda cyklu přibližně 24 hodin. Základní smyčka je zajišťována transkripčními faktory CLOCK a BMAL1, které společně dimerizují a vážou se na sekvenci označovanou jako E-box v promotorech genů *Period* (*Per1*, *Per2*) a *Cryptochrom* (*Cry1* a *Cry2*). Tím dochází k jejich transkripci a následně translaci. Při dostatečném množství proteiny PER a CRY interagují s CLOCK a BMAL1 a tím inhibují jejich činnost jakožto transkripčních faktorů. Správně načasovaná degradace PER a CRY odstraní blokaci BMAL1 a CLOCK a startuje tak nový cyklus (Brancaccio et al., 2014). Krom E-boxu je v promotoru genu *Per* i D-box, kam se váží transkripční aktivátory rodiny PAR bZip a transkripční represor E4BP4 (Doi et al., 2011).

K zajištění periodičnosti je potřeba ještě další smyčky, ta je představována jadernými receptory ROR  $\alpha, \beta, \gamma$  (angl. *retinoic acid receptor-related orphan receptor*) a Rev-erb  $\alpha, \beta$  (angl. *reverse Erb  $\alpha/\beta$* ). Společně se váží na promotor RRE (angl. *receptor response element*) a spouští transkripci *Bmal1* (Chi-Castañeda and Ortega, 2016).



Obr. 2: Molekulární mechanismus vnitřních hodin. Cirkadiánní oscilace je představována autoregulační transkripční sítí vzájemně se ovlivňujících genů a jejich produktů, kde hlavní roli hraje heterodimer CLOCK/BMAL1 indukující transkripci *Per* a *Cry*. Na komplexitě a robustnosti procesu se kromě toho podílí i další proteinové komponenty. (Upraveno dle Chi-Castañeda and Ortega, 2016)

Mimo této základní regulace se na ději podílí celá řada dalších proteinů, mimo jiné podstupující rozsáhlé posttranslační modifikace, které celému systému vnitřních hodin dodávají na stabilitě. Přestože pro zachování rytmicity v tělních buňkách a v jednotlivých neuronech SCN jsou nezbytné funkční geny *Per1*, *Per2* a *Cry1*, v rámci interagující neurální sítě SCN mohou být mutace těchto genů kompenzovány (Liu et al., 2007). Mutací hodinových genů dochází k variacím cyklu jako prodlužování periody u mutantních homozygotů v genu *Clock*, či úplné ztrátě rytmicity u mutantních homozygotů (Herzog et al., 1998). K delší periodě dochází i u mutací v genech *Per3* a *Cry2* (Liu et al., 2007). Ke změnám v expresi v hodinových genech dochází i při alteraci v membránovém potenciálu neuronů. Exprese *Per1* pozitivně koreluje s frekvencí akčních potenciálů neuronů SCN (Quintero et al., 2003), při inhibici napěťově otevíraného  $\text{Na}^+$  kanálu se amplituda *Per1* oscilací redukuje a stejně tak dochází k narušení periodičnosti *Per1* při hyperpolarizaci SCN neuronů (Lundkvist et al., 2005).

Mimo nezpochybnitelnou roli hodinových genů v řízení cirkadiánních rytmů byla zjištěna i jejich účast na řízení procesů jako je přijímání glutamátu (Glu) kortikálními astrocyty (Beaulé et al., 2009). Spangel ve své studii prokázal, že astrocyty vykazují cirkadiánní rytmy v expresi *Glast* (*EAAT1*), stejně tak jako v množství GLAST proteinu, který slouží jako membránový transportér pro Glu. Tento cirkadiánní charakter je narušen u mutantů v genu *Per2* (Spangel et al., 2005). Pozdější studie v této oblasti potvrdila, že hodinové geny *Per2*, *Clock* a *NPAS2* regulují expresi *Glast*, ovšem vyvrátila, že by transkripce *EAAT1* byla cirkadiánní (Beaulé et al., 2009). Rozdílné závěry mohou ovšem být

způsobeny odlišnou metodologií – zatímco dřívější pracovala s tkání SCN, pozdější s kulturou astrocytů.

Narušení cirkadiánních rytmtů je spojeno s poruchami spánku, depresemi, bipolární poruchou i změnami v kognitivních funkcích a konsolidací paměti (Masri and Sassone-Corsi, 2013). Mutace genu *Clock* je spojena také s rozvojem obezity a metabolického syndromu (Turek et al., 2005).

## Rytmicita

Cirkadiánní rytmicita a s ní spojené molekulární procesy jsou konzervované od bezobratlých živočichů až po savce včetně člověka (Jackson, 2011).

Každý jednotlivý neuron v rámci SCN je schopen pracovat jako samostatný generátor rytmické aktivity (Welsh et al., 1995), ovšem díky komplexnímu informačnímu propojení neuronů dochází v rámci této informační sítě ke vzájemné synchronizaci a tím i schopnosti celku zachovávat rytmicitu i přes možné mutace v jednotlivých neuronech (Herzog et al., 1998; Liu et al., 2007). Vzájemné intercelulární interakce nejsou plně objasněny. Svou roli hrají vodivé spoje (Colwell, 2005), VIP (Aton et al., 2005), GABA (Barca-Mayo et al., 2017), Glu (Brancaccio et al., 2017) a cAMP (O'Neill et al., 2008). Na synchronizaci neurální sítě SCN má také zásadní vliv populace *Nms* neuronů. Název je odvozen od exprese neuromedínu S, která doprovází přibližně 40 % SCN neuronů jak AVP tak VIP. Blokování synaptického přenosu u těchto pacemakerů narušilo synchronizaci a stejně tak mutace v hodinových genech u těchto neuronů vedla ke změnám v behaviorálních cirkadiánních rytmech (Lee et al., 2015).

Proces TTFL je spjat s intra- a intercelulárními procesy, jejichž charakter není plně znám, zásadní role ovšem zastávají zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , cAMP, elektrická aktivita neuronů a VIP signalizace. Mezibuněčná komunikace vede k aktivaci receptorů spojených s G-proteiny třídy  $G_s$ ,  $G_i$  a  $G_q$ , což vede ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  a  $[cAMP]_i$  a aktivaci CRE elementu, DNA sekvenci spojenou s některými hodinovými geny. K narušení aktivace CRE elementu dojde jak při aplikaci tetrodotoxinu demonstrující kruciální elektrickou aktivitu, tak při potlačení VIP signalizace mezi neurony (Brancaccio et al., 2013). Příkladem klíčové buněčné komponenty určující intercelulární synchronizaci SCN je regulační protein RGS16, jehož exprese je pod kontrolou hodinových genů a jeho zvýšené množství ve specifický cirkadiánní čas umožňuje díky inhibici  $G_{\alpha i}$  aktivaci cAMP signalizace v SCN, která je nezbytná pro specifickou transkripci *Per1* v dorsomediálních buňkách SCN. Narušení této dráhy je spojeno s prodloužením cirkadiánní periody (Doi et al., 2011). Na změnu  $[Ca^{2+}]_i$  mají přímý vliv

receptory spojené s  $G_q$ , jejichž aktivace je spolu s VIP signalizací schopna irreverzibilně přeprogramovat nastavení vnitřních hodin (Brancaccio et al., 2013).

V souvislosti se změnou  $[Ca^{2+}]_i$ , která se u neuronů cyklicky mění (Colwell, 2000), se uvažuje, že se na synchronizaci rytmické aktivity SCN a regulaci genové exprese hodinových genů podílí vstup  $Ca^{2+}$  skrze napěťově závislé  $Ca^{2+}$  kanály. Jejich exprese v buňkách SCN probíhá s největším zastoupením pro L typ, dále následovaným P/Q a T typem, jejichž transkripce je v buňkách rytmická (Nahm et al., 2005). Při aplikaci kadmia, neselektivního inhibitoru  $Ca^{2+}$  kanálů, došlo k narušení oscilací *Per2* a *Bmal1* (Nahm et al., 2005) a také synchronizace neurální excitace u SCN neuronů (Shirakawa et al., 2000). V generování cirkadiánní rytmicity mají také roli draslíkové proudy zprostředkované vápníkem aktivovanými BK kanály. Aktivita tohoto kanálu se periodicky mění a tento děj přispívá k vyšší frekvenci akčních potenciálů během dne a nižší během noci (Pitts et al., 2006).

## Epifýza a melatonin

Epifýza, česky jinak šišinka, je žláza hypotalamu, která rytmicky produkuje hormon melatonin. Jeho hladina je u obratlovců nejvyšší během noci a u primátů iniciuje nástup spánku a pokles tělní teploty. Působení hormonu ovšem není uniformní, např. u některých hlodavců bylo zjištěno, že se šišinka v řízení spánkových a denních rytmů nepodílí a jinak také melatonin působí u nočních a denních zvířat (Shuboni et al., 2016). Jiným příkladem jsou měnící se hladiny melatoninu v závislosti na migrační sezóně u stěhovavých ptáků (Gwinner et al., 1997). U ptáků epifýza představuje centrální hodiny, byly v ní nalezeny hodinové geny, jejichž exprese se podobá té, ke které dochází u savčího SCN (Fukada and Okano, 2002).

Melatonin vzniká z tryptofanu, který je díky tryptofan-hydroxyláze přeměňován na 5-hydroxytryptofan, který je dekarboxylován na serotonin. Ze serotoninu vzniká díky enzymu aralkylamin N-acetyltransferáze (AA-NAT) N-acetylserotonin (NAS). Enzym acetylserotoninmethyltransferáza (ASMT) dále metyluje NAS na melatonin (Pevet and Challet, 2011).

## Vztah mezi melatoninem a SCN

SCN reguluje cirkadiánní syntézu melatoninu prostřednictvím sympatické inervace, díky které působí na buňky epifýzy noradrenalin vázající se na  $\beta_1$  adrenergní receptory a ATP vázající se na  $P2Y_1$  receptory (Souza-Teodoro et al., 2016). ATP snižuje syntézu melatoninu prostřednictvím inhibice transkripce a translace klíčového enzymu ASMT přeměňující NAS,



jeden z prekurzorů, na melatonin. Noradrenalin naopak reguluje množství enzymu AA-NAT konvertující serotonin a NAS. Opačný efekt než má ATP je k vidění u působení neuropeptidu Y (NPY), který naopak zvyšuje produkci melatoninu (Vacas et al., 1987) prostřednictvím zvýšené dostupnosti enzymu ASMT (Souza-Teodoro et al., 2016).

Receptory pro melatonin jsou přítomny hlavně v SCN a v *pars tuberalis*, což je oblast zprostředkovávající přenos informace z vnitřních hodin na periferii (Stehle et al., 2003). Melatonin je tedy schopen zpětnovazebně působit na SCN, kde jsou přítomny dva typy jeho receptorů – MT1 (Mel<sub>1A</sub>) a MT2 (Mel<sub>1B</sub>) (Peters et al., 2005b). Přestože se melatonin nepodílí na generování rytmů ani na udržení oscilace, je schopen do jisté míry rytmy modulovat (Stehle et al., 2003). Při aktivaci MT2 receptoru dochází v myším SCN k posunu fáze cirkadiálního rytmu (Hunt et al., 2001) a při aktivaci receptoru MT1 k potlačení excitability neuronů (Liu et al., 1997). Nezastupitelnou roli má melatonin naopak v *pars tuberalis*, kde přímo určuje rytmickou aktivitu (Stehle et al., 2003). U křeččího SCN bylo prokázáno, že melatonin je schopen podobně jako světlo reprogramace cirkadiálních rytmů, ale pouze u fetálního SCN, poté se citlivost ztrácí (Grosse and Davis, 1998), což je nejspíše dáno rozdílným zastoupením receptorů ve srovnání s myší.

## ATP jako signální molekula

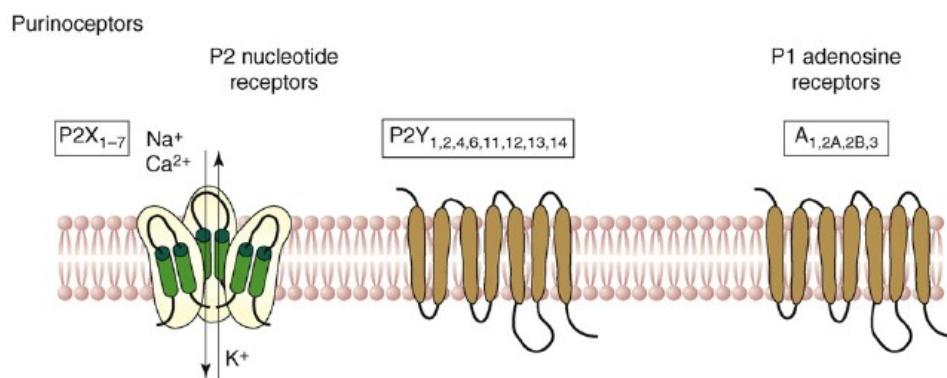
ATP neboli adenosintrifosfát je molekula skládající se z molekuly ribózy, na kterou je vázána nukleová báze adenin a tři fosfáty. Intracelulární koncentrace ATP se liší v závislosti na typu buňky, ovšem jeho průměrná koncentrace se v buňce pohybuje kolem  $3,152 \pm 1,698 \mu\text{M}$ . Koncentrace v extracelulárních tekutinách je obvykle nižší, v rozmezí  $0,4\text{--}6 \mu\text{M}$  (Traut, 1994). Díky množství energie, které se uvolňuje během jeho hydrolýzy, je tato molekula všeobecně známá jako nejběžnější energetické platidlo, na němž je závislá většina metabolických pochodů probíhajících v živých buňkách. Vedle této nezpochybnitelné role byla v 70. letech minulého století uveřejněná hypotéza představující ATP v nové roli neurotransmiteru (Burnstock, 1972), která se přes pochyby vědecké komunity ukázala být správná.

Krom samotného ATP se jako signální molekuly uplatňují také produkty jeho hydrolýzy, ADP, AMP a adenosin (Burnstock, 2009). Souborně se tyto molekuly a jejich různorodé působení prostřednictvím tzv. purinergních receptorů sdružují pod pojmem purinergní signalizace.



## Purinergní receptory

V systému purinegních receptorů jsou definované dvě základní skupiny P1 a P2, která se dále dělí na P2X a P2Y. Skupina P1 zahrnuje receptory pro adenosin, kde lze dále rozlišit podtypy  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$ . Patří mezi typicky metabotropní a přenos signálu je proto spjat s trimerními G-proteiny (Corriden and Insel, 2010); konkrétně pro  $A_1$  a  $A_3$  s třídou  $G_{i/o}$  inhibující adenylátcyklázu a  $G_s$  stimulující produkci cAMP pro  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  (Abbracchio et al., 2009).



Obr. 3: **Purinergní receptory**. P1 třída představuje receptory pro adenosin a P2 třída receptory pro nukleotidy, která zahrnuje P2X ionotropní receptory a P2Y metabotropní receptory. (Upraveno dle Abbracchio et al., 2009)

Receptory patřící ke skupině P2X jsou ionotropní a zahrnují 7 subtypů ( $P2X_{1-7}$ ). Každý receptor funguje jako trimer, jehož každá podjednotka obsahuje dvě transmembránové domény. C i N koncová doména směřují do cytosolu a extracelulární smyčka o 10 cysteinových zbytcích obsahuje vazebné místo pro ATP. Vlastnosti tohoto trimerního póru závisí na skladbě podjednotek, může být buď homomultimerní nebo heteromultimerní (Abbracchio et al., 2009). Jednotlivé podtypy se liší také místem výskytu, např. v laterálním hypotalamu je heterogenní populace P2X receptorů složená z podjednotek  $P2X_2$ ,  $P2X_4$  a  $P2X_6$  receptorů (Jo and Role, 2002).

Receptory skupiny P2Y jsou metabotropní, spřažené především s G-proteiny třídy  $G_{q/11}$ , ale i  $G_{i/o}$  ( $P2Y_{12,13}$ ) a  $G_s$  ( $P2Y_{14}$ ), a dělí se na 8 subtypů ( $P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$ ). N koncová doména je extracelulární a C koncová doména je intracelulární. Aktivace probíhá krom navázání ATP/ADP i vazbou UTP/UDP a u  $P2Y_{1,2,4,6,11}$  vede ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , zatímco u  $P2Y_{12-14}$  má přesně opačný účinek (Lommen et al., 2017).

## Purinergní signalizace

Purinergní signalizace je široce rozšířený jev, prakticky každá buňka eukaryotického organismu má na své membráně P2 receptory. Podílí se jak na komunikaci mezi buňkami v rámci nervového systému, tak mimo něj.

Působení ATP reguluje vaskulární tonus. K vasokonstrikci dochází aktivací P2X<sub>1</sub> receptorů prostřednictvím ATP, které se uvolňuje spolu s noradrenalinem (NA) v periferních nervech, dochází k průtoku Ca<sup>2+</sup> a stažení hladkého svalstva. Naopak při hypoxii nebo ischemii je ATP uvolňováno z endoteliálních buněk a prostřednictvím P2 receptorů, P2Y<sub>1</sub> a P2Y<sub>2</sub>, spouštějící signální kaskádu vedoucí k produkci oxidu dusnatého (NO) dochází k vasodilataci, čímž dojde ke zvýšení krevního tlaku (Lohman et al., 2012).

Dále se ATP podílí na zánětlivé reakci, včetně té chronické (Idzko et al., 2014) a iniciuje tvorbu zánětlivých mediátorů prostřednictvím aktivace P2X<sub>7</sub> receptorů. Stimulace P2X<sub>7</sub> receptorů má cytotoxické dopady a roli v neurodegenerativních procesech; tento receptor byl popsán také jako receptor smrti (angl. *death receptor*) – jeho aktivace vede k iniciaci mnoha kaspáz, které jsou zapojeny do apoptických kaskád (Le Feuvre et al., 2002). Posledně zmíněný děj je spojen především s vysokou koncentrací ATP v extracelulárním prostoru doprovázející patologické podmínky jako zánět nebo trauma, která aktivuje právě nízkoafinní purinergní receptory jako P2X<sub>7</sub> (Ryu et al., 2010). ATP je vylučované také jako signální molekula neutrofilů zprostředkovávající jejich chemotaxi k místu potřeby (Yu Chen et al., 2006).

ATP také působí jako růstový faktor a svou roli hraje také při tvorbě rakovinotvorných buněk, kdy na jejich membránách je zvýšený výskyt P2X<sub>7</sub> receptorů (Corriden and Insel, 2010). Jako signální molekula stimulující migraci a proliferaci buněk působí ATP ve vývoji. Např. během embryonálního vývoje savčího mozku působí extracelulární ATP jako signální molekula iniciující proliferaci a inhibující diferenciaci kmenových buněk míchy (Lin et al., 2007; Ryu et al., 2003) a také stimulující migraci progenitorových astrocytů (Striedinger et al., 2007). Svou roli hraje ATP při angiogenezi indukované prostřednictvím P2Y receptorů (Rumjahn et al., 2009) a také endokrinní a exokrinní exkreci (Burnstock, 2006a).

Jak v centrální tak v periferní nervové soustavě působí ATP jako neurotransmiter. Je uvolňován samostatně nebo jako kotransmiter; v periferních nervech s doprovodu NA, NPY, VIP, substance P, NO, CGRP, acetylcholinem (ACh) a v centrálním nervovém systému spolu s ACh, noradrenalinem (NA), GABA, dopaminem a Glu (Abbracchio et al., 2009). Například v paraventriculárním jádru dochází k uvolňování ATP spolu s Glu a prostřednictvím non-

NMDA receptorů a P2X receptorů přítomných na presynaptických neuronech dochází k pozitivní modulaci excitability sympatického systému (Ferreira-Neto et al., 2013).

Jako neurotransmitter se ATP podílí na komunikaci mezi neurony a gliemi, ovlivňuje excitabilitu neuronů (Newman, 2003) a synaptickou transmissi (Zhang et al., 2003). Roli hraje také při přenosu bolesti (Gerevich and Illes, 2004). Vlivem ATP dochází k mechanosenzorické transdukcii v močovém měchýři, střevě a močovodu. Při roztažení tkáně se z epitelálních buněk uvolňuje ATP a působí na P2X<sub>3</sub> a P2X<sub>2/3</sub> receptory na senzorních nervech, čímž přecházejí stimuly do center bolesti v mozku (Burnstock, 2006b). Jako signální molekula působí ve smyslových orgánech, retině (Newman, 2001), chuťových pohárcích (Liu et al., 2008) a sluchových buňkách (Bell et al., 2003).

V rámci CNS přispívá ATP k obranným mechanismům. Poškození nervové soustavy, chronické i akutní, vede k masivnímu nárůstu extracelulární koncentrace ATP. To působí jako signál pro mikroglie, které jsou schopny mobilizovat své výběžky a ohraničit tak zraněnou tkáň od zdravé (Davalos et al., 2005). Na procesu se podílejí i astrocyty, které pod vlivem ATP vylučují další ATP stimulující mikroglie a mimoto také aktivaci svých P2X<sub>7</sub> a P2Y<sub>1,2</sub> proliferují a dochází k jevu nazývanému astroglióza sloužící k minimalizaci a opravě škod (Franke and Illes, 2014). Oproti tomu, změny v iniciálním segmentu neuronu, které jsou spojeny s patologickými procesy doprovázející ischemii, ale i řadu onemocnění, jsou spojeny právě s aktivací P2X<sub>7</sub> receptorů prostřednictvím zvýšené koncentrace ATP a tím spuštění přestav vedoucí mimo jiné i ke změnám v neurální excitabilitě (del Puerto et al., 2015). P2X<sub>7</sub> receptor je spjat se zánětlivými procesy i regulací patofyziologie psychiatrických a neurodegenerativních onemocněních jako deprese, Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba, deprese nebo epilepsie (Sperlágh and Illes, 2014).

Purinergní signalizace se také podílí na vyšších kognitivních funkcích, např. v hipokampu CA1 neuronů se ATP spolu s Glu se podílí na dlouhodobé potenciaci, která je podstatou učení a paměti (Pascual, 2005). ATP má také nezastupitelnou roli v regulaci spánku a procesech, které ho doprovázejí (Dworak et al., 2010). Také ATP vylučované astrocyty se ukázalo být nezbytné pro modulaci depresivního chování – nejspíše díky působení na P2X<sub>2</sub> receptory neuronů působí toto ATP antidepresivně (Cao et al., 2013).

## Astrocyty

Astrocyty patří mezi glie, buněčnou linii, ke které se řadí krom nich ještě další dva typy buněk, mikroglie, zaujímající v mozku pozici makrofágů, a oligodendrocyty, ekvivalenty Schwannových buněk na periferii hrající roli především při myelinizaci axonů.

## Charakteristika astrocytů

Astrocyty představují heterogenní populaci buněk zahrnující např. radiální glie, protoplazmatické a fibrózní astrocyty, Müllerovy buňky retiny, Bergmannovy buňky mozečku a mnoho dalších. Disponují množstvím dlouhých výběžků, které mohou až desetinásobně přesahovat velikost těla. Ty jsou v kontaktu se synapsemi, s presynaptickou i postsynaptickou membránou, obklopují je a umožňují tak vzájemnou komunikaci, mluví se o tzv. tripartitní synapsi (Araque et al., 1999). Jednotlivé astrocyty mohou být vzájemně propojeny prostřednictvím vodivých spojů (angl. *gap junction*).

Na svém povrchu mají tyto gliové buňky řadu receptorů z řad cholinergních, adrenergních, peptidergických a purinergních, které jim umožňují reagovat na nejrozličnější neurotransmitery a neuromodulátory (Höslí and Höslí, 2000). Samy zároveň v reakci na okolní signální molekuly produkují své vlastní gliotransmitery, např. Glu, D-serin a ATP (Ng et al., 2011).

## Funkce astrocytů

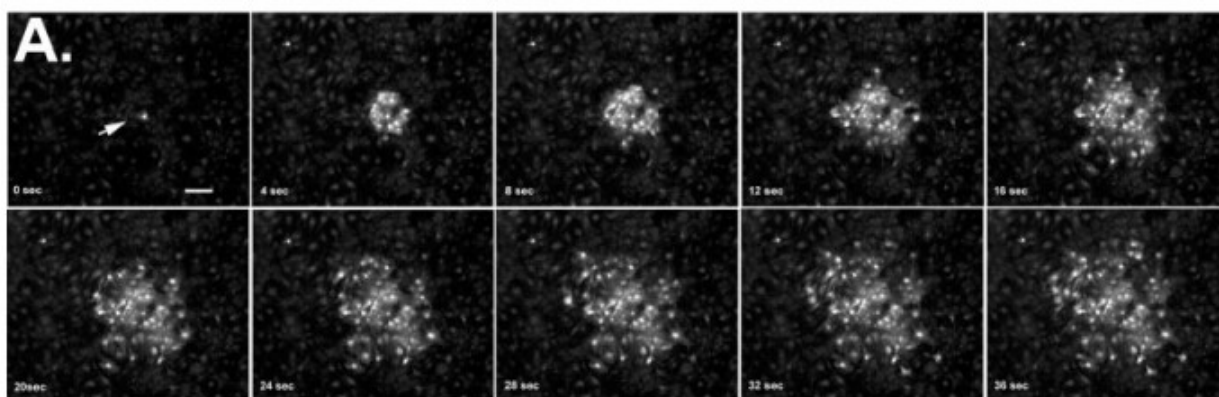
Astrocyty jsou nejvíce zastoupeným typem glií v mozku a odpovídá tomu i rozsah jejich fyziologického působení. Přestože původní teze pohlížela na astrocyty pouze jako na buňky podpůrné, dodávající nervové soustavě tvar, ukázalo se, že jsou důležitými partnery mnoha buňkám včetně neuronů, vaskulárních buněk, ale i jiným gliovým buňkám (Hamilton et al., 2010; Koizumi, 2010). Utváří hematoencefalickou bariéru (Kazuki eHarada et al., 2016), udávají mikroarchitekturu mozkové tkáně, prostřednictvím vylučování příslušných faktorů regulují synaptogenezi (Allen, 2013) zásobují neurony substrátem a spolu s mikrogliemi reprezentují obranný systém. V případě poškození jsou astrocyty schopny, za iniciace ATP a dalšími molekulami jako cytokiny a růstové faktory, proliferovat a agregovat a vytvořit tzv. gliovou jizvu, která izoluje poškozenou tkáň od zdravé (Franke and Illes, 2014). Také aktivně degradují protein  $\beta$ -amyloid, k jehož agregaci v podobě plaků dochází při Alzheimerově chorobě (Volterra and Meldolesi, 2005). Velmi důležitou funkcí je i jejich

schopnost modulovat aktivitu neuronů (Newman and Zahs, 1998) díky čemuž jsou astrocyty schopny podílet se svou regulací na udržování spánkové homeostáze a konsolidace paměti (Chi-Castañeda and Ortega, 2016).

Astrocyty zajišťují homeostázi v mozku i v míše regulací koncentrace iontů, neurotransmiterů a neuromodulátorů, jsou nezastupitelné v metabolismu dvou nejdůležitějších neurotransmiterů mozku, Glu a GABA (Arne eSchousboe et al., 2013). Prostřednictvím svých glutamátových transportérů GLAST a GLT-1 pohlcují Glu z okolí synapsí a tím moduluji synaptický přenos a vymezují specifický tok informace. Na rozdíl od neuronů také disponují enzymem glutamin syntetázou a syntetizují z Glu glutamin, nutný prekurzor pro syntézu Glu a GABA neurony (Lavialle et al., 2011). V SCN jsou astrocyty schopny díky mGluR3 a mGluR5 zaznamenávat glutamátární cirkadiánní aktivitu a modulovat svá filamenta, které interagují se synapsí neuronů (Lavialle et al., 2011). V centrální nervové soustavě také astrocyty pufrují koncentraci  $K^+$  iontů (KOFUJI and NEWMAN, 2004).

## Vápníkové vlny

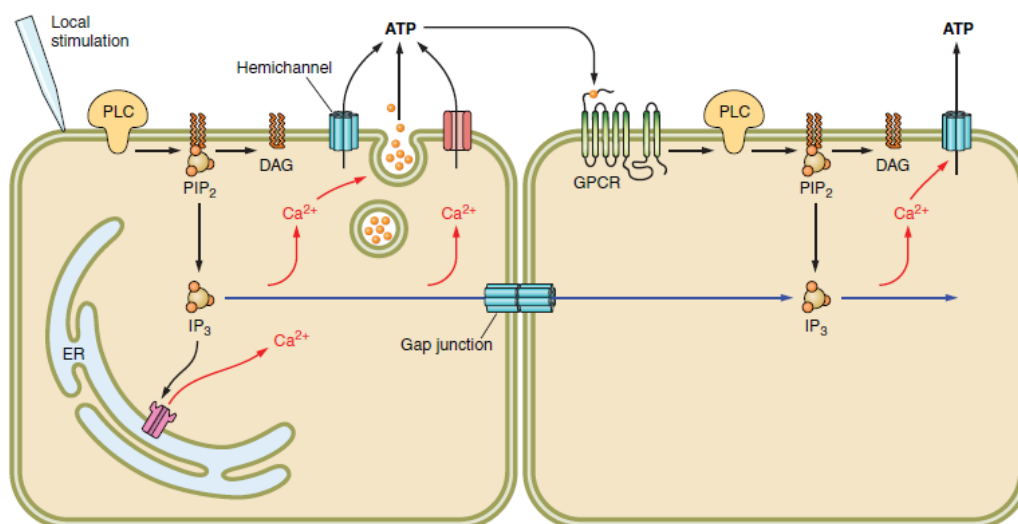
Role vápníku jako signální molekuly je dlouho poznáný jev. Jeho vliv je prokázán v mnoha buněčných typech a astrocyty nejsou výjimkou. Přestože tyto glie nejsou schopny excitace ve smyslu akčních potenciálů jako neurony, nejedná se o pasivní buňky. Při jejich aktivaci dochází ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , které se často děje prostřednictvím oscilací. Mohou být omezeny pouze na jednu buňku, a to pouze na určitou oblast tzv. mikrodoménu (Verkhratsky et al., 2012) anebo se šířit od této počáteční buňky dál do okolí, v takovém případě se mluví o tzv. vápníkových vlnách (Leybaert and Sanderson, 2012).



Obr. 4: **Astrocytární vápníkové vlny.** Mechanická stimulace jediného astrocytu vede ke vzrůstu intracelulární koncentrace vápníku u stimulované buňky, která je následně následována zvýšením intracelulární koncentrace vápníku i u sousedních astrocytů. (Upraveno dle Scemes and Giaume, 2006)

Vápníkové vlny jsou hlavním komunikačním prostředkem mezi astrocyty navzájem a také mezi astrocyty a neurony. K iniciaci vápníkových vln dochází v odpovědi na vazbu signálních molekul např. neurotransmiterů na receptory přítomné na membráně, ale i spontánně bez jakéhokoli stimulu (Bowser and Khakh, 2004; Parri et al., 2001). Mezi buňkami se šíří buď prostřednictvím vodivých spojů umožňující difuzi inositol-1,4,5-trifosfátu (IP<sub>3</sub>) do sousedních buněk (Newman, 2001), ale především parakrinně díky ATP, které se při zvýšení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> vylučuje z buňky (Guthrie et al., 1999) a umožňuje tak šíření vlny prostřednictvím své vazby na P2Y receptory okolních astrocytů. Přítomnost vápníkových vln jako odpověď ATP je dokázána nejenom u astrocytů, ale i Müllerových buněk retiny (Newman and Zahs, 1997) nebo třeba buněk slinných žláz (Ryu et al., 2010) a mnoha dalších. Navázání ATP na P2 receptor vede k regenerativnímu vyloučení dalšího ATP, což má velký význam pro šíření vápníkových vln (Anderson et al., 2004).

Mezi hlavní buněčné kompartmenty podílející se na vápníkové signalizaci patří cytoplasma, endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie. Protože je vyšší hladina [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pro buňku toxická, jsou vápníkové ionty skladovány v ER a mitochondriích nebo jsou díky plazmatických Ca<sup>2+</sup> ATPázám a antiportem se sodíkem transportovány do extracelulárního prostoru, přičemž je v cytoplasmě udržována [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> kolem 30 – 100 nM (Verkhratsky et al., 2012).



Obr. 5: **Šíření vápníkových vln.** Aktivací PLC vzniká IP<sub>3</sub>, který otevírá kanály na ER nebo se prostřednictvím vodivých spojů šíří do okolních buněk. Aktivovaná buňka také může uvolňovat ATP prostřednictvím nejrůznějších metabolismů závislých i nezávislých na vápníku. Difúzí se ATP šíří k sousedním buňkám a váže se na jejich P2 receptory, což vede k regenerativní produkci IP<sub>3</sub>. (Upraveno dle Leybaert and Sanderson, 2012)

Vápník se do cytosolu dostává z intracelulárních zásob v ER, které jsou mobilizovány díky vazbě IP<sub>3</sub> na příslušné receptory, IP<sub>3</sub>Rs. IP<sub>3</sub> vzniká spolu s DAG působením PKC rozkládající PIP<sub>2</sub>. PKC je spřažena s metabotropními receptory (Haydon, 2001), mezi které patří i purinergní P<sub>2</sub>Y. Po vylití Ca<sup>2+</sup> z ER je organela opět naplněna cytosolickým vápníkem díky aktivitě Ca<sup>2+</sup> ATPázy SERCA (Verkhatsky et al., 2012).

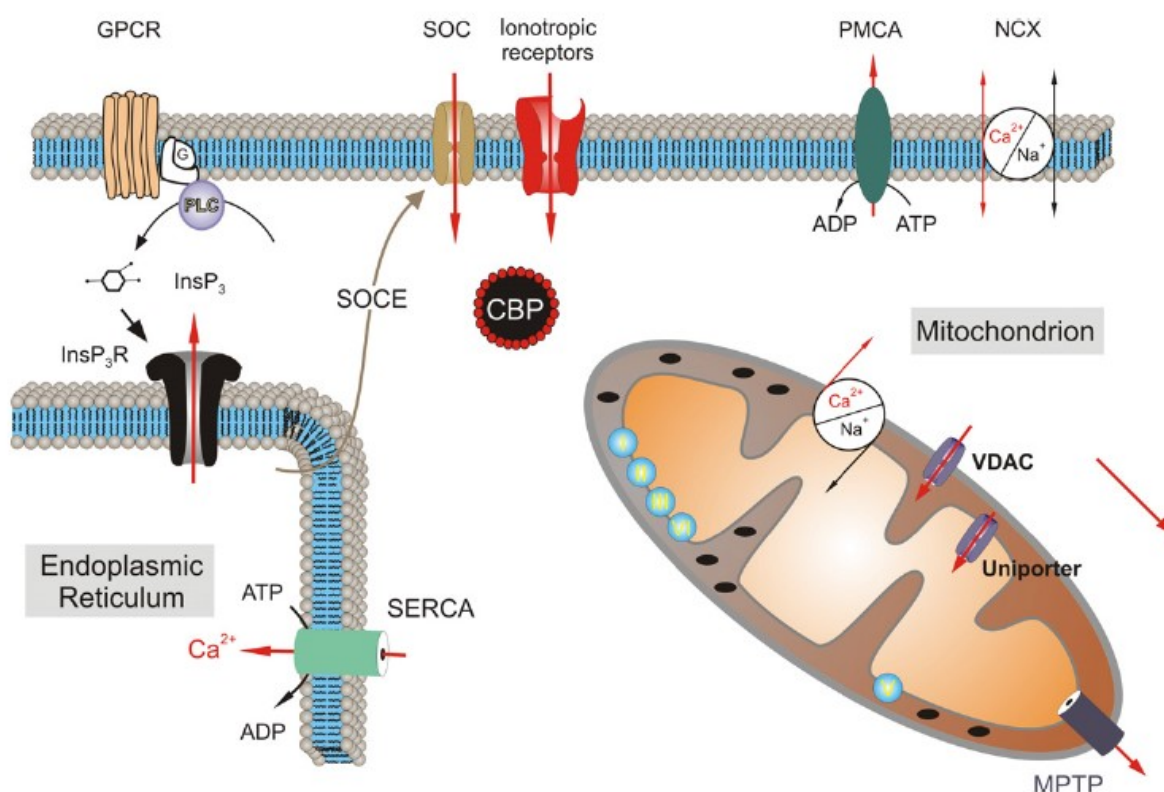
Vápník extracelulárního prostoru se na počátečním zvýšení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nepodílí, přesto je nepostradatelný pro doplňování vnitřních zásob při dlouhodobější stimulaci (Peuchen et al., 1996) a určování celkového charakteru intracelulární vápníkové signalizace. Po vyprázdnění intracelulárních zásob v ER se zvýší permeabilita plazmatické membrány (PM) pro Ca<sup>2+</sup> a dochází k ději označovanému jako kapacitní Ca<sup>2+</sup> vstup, CCE (z angl. *capacitative Ca<sup>2+</sup> entry*) (Kuo-Jung Lo et al., 2002), při kterém vtékají Ca<sup>2+</sup> ionty prostřednictvím SOC<sub>s</sub> (z angl. *store-operated Ca<sup>2+</sup> channels*) tvořenými kanály TRP (Golovina, 2005) a dalšími proteiny. Průnik Ca<sup>2+</sup> iontů z extracelulárního prostoru umožňuje plateau fázi vápníkové odpovědi, ke které dochází po rychlém zvýšení a opětovnému snížení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Proudění iontů prostřednictvím SOC<sub>s</sub> probíhá v oblastech, kde dochází k těsnému přiblížení PM s ER, tzv. PM-ER junction. To umožňuje regulaci koncentrace vápníku v ER nezávisle na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Golovina, 2005).

Mitochondrie jsou stejně jako ER buněčnými zásobárnami vápníku (Parpura and Zorec, 2010) a jsou schopny vápníkovou koncentraci v cytosolu pufovat (Simpson and Russell, 1998). Fungují jako entity, které přebytečný vápník čerpají z cytosolu prostřednictvím VDAC přítomného na vnější membráně a mitochondriálního Ca<sup>2+</sup> uniporteru (MCU) umístěného ve vnitřní mitochondriální membráně (IMM). Proces je usnadněn negativním elektrochemickým potenciálem na IMM. V případě potřeby ho do cytosolu dodávají díky Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> výměníku typu NCLX (Stephen et al., 2014). Mitochondrie jsou s ER v těsném kontaktu označovaném jako MAMs, (angl. *mitochondria-associated ER membranes*), kde je koncentrováno velké množství chaperonů a IP<sub>3</sub>Rs typu 3, což umožňuje blízkou spolupráci mezi těmito dvěma kompartmenty (Lavialle et al., 2011). Svou schopností přijímat a uvolňovat vápník mitochondrie pozitivně i negativně modulují otevírání IP<sub>3</sub>Rs, jenž je citlivé na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Leybaert and Sanderson, 2012). Při nižší koncentraci se pravděpodobnost otevření zvyšuje. Mitochondrie jsou tedy schopny regulovat uvolňování vápníku z ER a tím kontrolovat kinetiku a propagaci vápníkových vln (Simpson and Russell, 1998). Navíc MCU má velmi nízkou afinitu pro vápník a za běžné [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> je uzavřený, otevírá se v případě vyloučení Ca<sup>2+</sup> z ER, kdy se překročí práh nutný pro jeho aktivaci. U HeLa buněk bylo zjištěno, že správně načasovaná výměna Ca<sup>2+</sup> mezi ER, mitochondriemi a cytoplasmou je podstatou pacemakerové aktivity vápníkových oscilací (Ishii et al., 2006).



Celý proces probíhá následovně: IP<sub>3</sub> indukuje uvolnění vápníku z ER, což je podstatou prvního vrcholu v  $[Ca^{2+}]_i$ , během tohoto plnění cytoplazmy vápníkem jsou zásobovány i mitochondrie, které následně fungují jako iniciátory druhého zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , kdy prostřednictvím svého  $Na^+/Ca^{2+}$  výměníku vyloučí určité množství  $Ca^{2+}$  do cytosolu a dochází k aktivaci IP<sub>3</sub>Rs a regenerativnímu vyloučení  $Ca^{2+}$  z ER, při kterém se opět částečně plní i mitochondrie.

Na charakter vápníkové odpovědi astrocytu má veliký vliv mitochondriální  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporter NCLX (Parnis et al., 2013), který je funkčně spjat s SOCs. Průnik  $Ca^{2+}$  z mitochondrií prostřednictvím NCLX usnadňuje otevírání těchto kanálů, proto při inhibici NCLX dojde i k omezení průniku  $Ca^{2+}$  z extracelulárního prostoru. To má za následek celkové snížení množství cytosolického vápníku během aktivace astrocytu a s tím i omezení exocytózy či proliferace astrocytů. Vliv mitochondriálního  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporteru prokázali i



Obr. 6: **Princip vápníkové signalizace v astrocytech.** Hlavními buněčnými zásobárnami  $Ca^{2+}$  jsou ER a mitochondrie. Výměna mezi těmito kompartmenty a cytoplazmou probíhá díky membránovým kanálům, transportérům a ATPázám. Z ER do cytoplazmy se  $Ca^{2+}$  dostává vlivem IP<sub>3</sub> otevírající příslušné kanály, zpět je vápník pumpován díky  $Ca^{2+}$  ATPáze SERCA. Pohyb  $Ca^{2+}$  přes mitochondriální membrány je zprostředkován výměníkem NCX, kanály VDAC a MPTP a uniporterem na vnitřní membráně. Přes plazmatickou membránu se  $Ca^{2+}$  dostává díky ATPáze a výměníkem s  $Na^+$ , v případě potřeby do cytoplazmy vtéká skrze SOCs. (Upraveno dle Verkhratsky et al., 2012)



Reyes a Parpura, když se při aplikaci jeho inhibitoru CG37157 snížila  $[Ca^{2+}]_i$  a následně i množství exocyticky vyloučeného Glu (Reyes and Parpura, 2008). K narušení SOCů proudů došlo i při aplikaci protonophoru FCCP, který zrušil membránový potenciál v mitochondriích (Parnis et al., 2013).

Pozitivní vliv mitochondrií na vstup  $Ca^{2+}$  z extracelulárního prostoru a s tím spojeném repetitivním charakteru vápníkové odpovědi byl prokázán i u buněk slinných žláz, které stejně jako astrocyty uváděné výše, komunikují prostřednictvím extracelulárního ATP (Ryu et al., 2010).

Vápníkové vlny u astrocytů nejsou uniformní (Henneberger et al., 2010). Liší se charakterem svého působení v čase a v prostoru i v celkovém množství  $Ca^{2+}$ , které se do nich zapojuje. Rozdíly mezi vápníkovými vlnami také mohou plynout z heterogenity různých populací astrocytů. Například při srovnání vápníkových vln mezi astrocyty mezimozku u kuřete a myši zahrnují ty myši vápníkové vlny mnohem více buněk a šíří se rychleji ve srovnání s analogickými buňkami kuřete (Peters et al., 2005b). Odlišný charakter vápníkových vln je nejspíše dán rozdílným propojením buněk – zatímco u kuřete se šíří díky vodivým spojmům (Peters et al., 2005a), u myši parakrinně díky ATP (Guthrie et al., 1999).

Vápníkové vlny mohou iniciovat vylučování gliotransmiterů z astrocytů, ale také sloužit pouze jako komunikační prostředek mezi astrocyty. U astrocytů oblasti CA1 hipokampu bylo prokázáno, že jak aktivace PAR-1, tak  $P2Y_1$  receptorů na membráně astrocytů vede ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , ale pouze při stimulaci PAR-1 receptorů došlo k vyloučení Glu, který následně vyvolal na přilehlých pyramidových neuronech pomalé proudy, SICs (z angl. *slow inward currents*) (Shigetomi et al., 2008). Vápníkové vlny také ovlivňují metabolismus astrocytů. Astrocyty kuřecího mezimozku exprimují receptory pro melatonin, konkrétně typ  $Mel_{1C}$  a v menší míře také MT1 (Peters et al., 2005a) a jejich aktivací dochází k inhibici glykolytické aktivity a naopak se stimuluje glykogenová aktivita (Adachi et al., 2002).

## Gliotransmitery

Astrocyty jsou s neurony ve velmi těsném vztahu a díky svým početným membránovým receptorům (Höslí and Höslí, 2000) jsou schopny reagovat na molekuly ve svém vnějším okolí, mimo jiné přítomné i jako výsledek neurální aktivity. Odpovědí astrocytu na aktivaci svých receptorů je zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  potencující případné vyloučení gliotransmiterů. To jsou chemikálie, které jsou syntetizovány a skladovány v gliích, schopny recipročně

ovlivňovat aktivitu neuronů, neurální excitabilitu, uvolňování transmitterů a synaptickou plasticitu. Působení gliotransmitterů je široce rozšířený jev vyskytující se od Bergmannových buněk a astrocytů hipokampu až po Schwannovy buňky a Müllerovy buňky retiny (Auld and Robitaille, 2003). Signalizace mezi neurony a astrocyty se s věkem snižuje, což by mohlo být spojeno s poklesem kognitivních funkcí (Lalo et al., 2014a). K hlavním vylučovaným gliotransmitterům, na které se bude zaměřovat následující text, patří Glu (Parpura et al., 1994), D-serin (Schell et al., 1995) a ATP, ale dochází i k vylučování GABA, prostaglandinů a neuropeptidů (Sahlender et al., 2014).

D-serin je astrocyty produkován z L-serinu enzymem serin racemázou. Váže se jako ko-agonista na regulační místo NMDA receptoru, jehož obsazení buď glycinem nebo D-serinem je nutné k jeho aktivaci (Hamilton and Attwell, 2010). D-serin je v souvislosti s tímto receptorem spojen s procesy LTP a LDP v supraoptickém jádru (Panatier et al., 2006) a oblastí CA1 hipokampu (Henneberger et al., 2010).

Astrocyty oblasti CA1 hipokampu jsou také schopny vylučovat Glu, který je důležitý pro zachování morfologie synapse, podílí se na krátkodobé plasticitě a reguluje LTP. V závislosti na charakteru vápníkových změn v astrocytech (Ben Achour and Pascual, 2012) dochází buď k jeho vazbě na NMDA receptory postsynaptického neuronu nebo na mGluR5 receptory presynaptického neuronu, aktivace těchto metabotropních receptorů vede k synaptickému vyloučení Glu, který působí na NMDA a AMPA receptory postsynaptické membrány (Fiacco and McCarthy, 2004). Krom toho, Glu vázající se na extrasynaptické NMDA receptory, tj. receptory umístěné mimo synaptické místo, moduluje excitabilitu okolních neuronů - indukuje vyvolání tzv. pomalých proudů, které se od rychlých excitačních liší v kinetice svého nástupu, u skupiny asi 100 okolních neuronů (Fellin et al., 2004), což má za následek jejich synchronizaci. Uvolňování Glu astrocyty může být odpovědí na předchozí neurální aktivitu, kdy je vylučování Glu inhibováno aplikací tetrodotoxinu nebo antagonistou non-NMDA receptoru (Heinrich et al., 2012), ale také důsledkem spontánně vzniklé vápníkové vlny v astrocytech bez předchozí neurální aktivity (Parri et al., 2001). Astrocyty to staví do role jednotky samovolně iniciující neurální aktivitu, což by mohlo mít velký význam při vývoji nervové soustavy, přestože astrocytární vápníkové děje nejspíš nejsou nezbytné pro základní aktivitu neuronů v oblasti CA1 hipokampu (Petravicz et al., 2008).

## ATP v interakci mezi astrocyty a neurony

Velké množství experimentů bylo provedeno v oblasti hipokampu, kde je masivní zastoupení astrocytů, např. každý interneuron oblasti CA1 je v kontaktu s přibližně 27+/-5 astrocyty (Bowser and Khakh, 2004). Astrocyty této oblasti vylučují ATP v odpovědi na aktivaci svých glutamátových metabotropních receptorů (Porter and McCarthy, 1996), ale také NMDA receptorů (Heinrich et al., 2012). Uvolňování ATP je tedy odpovědí na neurální aktivitu a může být také doprovázeno i vylučováním Glu. Astrocytární ATP se může vázat na příslušné purinergní receptory na neuronech a přímo potlačovat synaptický přenos (Zhang et al., 2003). Mechanismus této heterosynaptické LTD není objasněn, ale bylo navrženo spřažení aktivace P2Y receptorů s inhibicí P/Q typu  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (Chen et al., 2013).

Krom toho může být toto ATP zdrojem pro degradující exoenzymy tvořící adenosin vázající se na  $A_1$  receptory neuronů, který stejně jako ATP zprostředkovává depresi synaptického přenosu (Sebastião et al., 1998). Pozdější studie ovšem, přestože nevyvrátila vylučování ATP astrocyty, jako zdroj adenosinu uvedla přímo neurony (Lovatt et al., 2012).

Prostřednictvím vylučování ATP jsou astrocyty CA1 oblasti hipokampu aktivované vazbou Glu na mGluR5 schopny modulovat synaptický přenos také díky aktivaci  $A_{2A}$  receptorů. Na rozdíl od aktivace  $A_1$  receptorů dochází v tomto případě ke zvýšení efektivity transmise u pyramidových buněk (Pاناتier et al., 2011).

Mimo Glu jsou astrocyty hipokampu schopny reagovat i na endogenně uvolňované ATP, jak z neuronů, tak z astrocytů. Odpovědí je uvolňování ATP, které se kromě šíření signálu mezi astrocyty (Guthrie et al., 1999) váže na  $P2Y_1$  receptory interneuronů, jejichž aktivace vede k zavření draselných kanálů typu K2P (Tan et al., 2017). Výsledkem je excitace neuronu a synaptické vyloučení GABA, který postsynaptickou membránu hyperpolarizuje (Bowser and Khakh, 2004).

ATP působí také jako presynaptický modulátor neurotransmise, váže se na  $P2X_2$  receptory axonů CA3 neuronů a usnadňuje tak excitační transmissi působící na interneurony v oblasti CA1, které se dále podílejí na procesování informačního přenosu v hipokampu. (Khakh et al., 2003). K velmi podobnému procesu dochází i v SCN, zde astrocytární ATP excitačně působí na přítomné neurony a stimuluje se tak uvolňování GABA. Váže se prostřednictvím  $P2X_2$  receptorů, jejichž aktivace pravděpodobně způsobí vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky (Bhattacharya et al., 2013). Uvedené děje jsou průkazem toho, že ATP nemusí působit jako primární signální molekula v podobě neurotransmiteru, ale jako regulátor vylučování jiných transmitterů.

Inhibiční efekt adenosinu byl popsán krom hipokampu i u neuronů v retině. Zde přítomné Müllerovy buňky v odpovědi na svou aktivaci vylučují ATP, které se působením exonukleáz rozkládá a vzniklý adenosin působí na  $A_1$  receptory neuronů. Tím dochází otevření  $K^+$  kanálů a hyperpolarizaci (Newman, 2003). Mezi aktivací glií a neuronů je přímá korelace, čili čím větší aktivace Müllerových buněk, tím větší inhibice, stejný efekt byl pozorován i u vztahu astrocyt-neuron v hipokampu (Porter and McCarthy, 1996). Müllerovy buňky jsou schopny se aktivovat vazbou ATP, které je vylučované neurony aktivované světlem (Newman, 2005).

Inhibiční efekt adenosinu je krucální i v tzv. homeostatickém řízení potřeby spánku. Adenosin se v průběhu dne hromadí v extracelulárním prostoru jako katabolický produkt ATP, které se uvolňuje exocytózou z astrocytů, a působí na  $A_1$  receptory, což tlumí neurální aktivitu (Halassa et al., 2009). Nedostatek tohoto ATP vede ke snížené potřebě spánku a také snižuje délku NREM spánku, během kterého probíhají hlavní regenerační procesy (Ben Achour and Pascual, 2012).

V neokortexu astrocyty vylučují  $Ca^{2+}$ -dependentní exocytózou ATP, které se podílí na zeslabení inhibičních synaptických přenosů a usnadňuje tak proces LTP. Váže na přítomné pyramidové neurony prostřednictvím postsynaptických P2X receptorů, což umožňuje zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  v neuronu vedoucí k fosforylaci postsynaptických a extrasynaptických GABAA receptorů a tedy jejich inhibici (Lalo et al., 2014b). Podobný způsob fascilitace LTP byl prokázán i u astrocytů v hipokampu (Pascual, 2005).

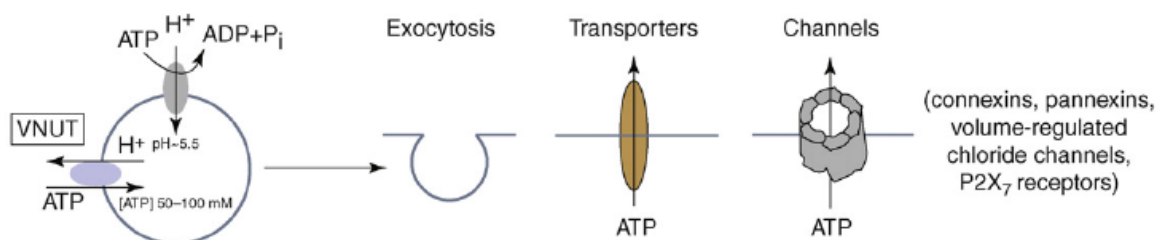
### **Mechanismy vylučování ATP z buňky**

Mimo zřejmého zdroje extracelulárního ATP v podobě buněčné lyze jsou buňky ATP schopny cíleně vylučovat prostřednictvím nejrůznějších mechanismů. Přestože se na toto téma vedou polemiky (Hamilton and Attwell, 2010), za nejvíce pravděpodobné ve fyziologických podmínkách se jeví uvolňování exocytózou (Coco et al., 2003; Lalo et al., 2014b; Pascual, 2005), které je závislé na tvorbě SNARE komplexu a činnosti  $v-H^+$ -ATPázy budující na membráně vezikulu protonový gradient sloužící jako pohon pro transport nukleotidu (Striedinger et al., 2007). Astrocyty exprimují proteiny, které jsou součástí SNARE komplexu - synaptobrevin2, syntaxin1, SNAP-23 a synaptotagmin (Parpura and Zorec, 2010). Krom toho se uvolňování ATP značně redukuje aplikací bafilomycinu- $A_1$ , inhibitoru  $v-H^+$ -ATPázy (Striedinger et al., 2007), inhibitory tvorby SNARE komplexu jako tetanus toxin a botulinum toxin (Bal-Price et al., 2002; Coco et al., 2003) nebo expresí dnSNARE proteinů (Lalo et al.,

2014b). Vezikuly skladující ATP jsou charakteristické přítomností VNUT1 (z angl. *vesicular nucleotide transporter*) (Lalo et al., 2014b) a umístěné pod plazmatickou membránou jako je tomu v případě kortikálních astrocytů nebo astrocytů hipokampu (Liu et al., 2011; Pangrsic et al., 2007).

Kromě zásobních vezikul podstupují exocytické vyloučení ATP i lysozomy (Zhijun Zhang et al., 2007). Populace lysozomů u kortikálních astrocytů není homogenní a asi jen kolem 20 % lysozomů je schopno podstupovat exocytózu (Li et al., 2008). Lysozomální i vezikulární exocytóza jsou obě závislé na  $\text{Ca}^{2+}$ , ovšem jejich kinetika je odlišná (Liu et al., 2011). Ta lysozomální exocytóza je mnohem pomalejší než vezikulární (Liu et al., 2011), nedochází k ní při spontánních vápníkových vlnách a je mnohonásobně usnadňována průnikem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z extracelulárního prostoru během ruptury membrány nebo díky  $\text{Ca}^{2+}$  ionophoru (Li et al., 2008). Pravděpodobně k ní tedy dochází především za patologických podmínek, kdy slouží jako mechanismus řídící zánětlivé procesy v mozku.

ATP release



Obr. 7: **Mechanismu vylučování ATP.** Na uvolňování ATP se podílí exocytóza, transportéry a kanály zahrnující konnexiny, pannexiny, P2X<sub>7</sub> a aniontové kanály. (Upraveno dle Abbraccio et al., 2009)

Přestože jsou o exocytóze přesvědčivé důkazy, jsou i další zjištěné mechanismy, kterými je ATP uvolňováno z buňky. Bylo prokázáno, že na uvolňování ATP se podílejí ABC proteiny (Ballerini et al., 2002), např. MDR1 (Abraham et al., 1993), a membránové kanály (Arcuino et al., 2002), často kanály pro anionty, protože většina ATP existuje ve fyziologickém pH jako molekula se záporným nábojem (Sabirov et al., 2001). Příkladem jsou maxi-anion kanály otevírané bez vápníkové signalizace při zvětšování objemu astrocytu (Liu et al., 2008), ale ATP je spojováno i s uvolněním díky CFTR a VSOR chloridovým kanálům (Sabirov and Okada, 2005).

Mezi další prokázané kanály umožňující průchod ATP patří hemikanály (Kang et al., 2008) nebo P2X<sub>7</sub> receptory (Sperlágh and Illes, 2014). Hemikanály, často otevřené za ischemických podmínek, jsou hexagonální multimery tvořeny šesti konnexiny (typ

Cx32, Cx37, Cx43). Spolu s partnerem v sousední buňce jsou schopny tvorby vodivého spoje (angl. *gap junction*), ale také samostatného umístění na membráně jako jednotky spojující cytoplasmu s extracelulární matrix, která umožňuje průchod molekul až do velikosti 1 kDa. Tyto kanály mohou být tvořeny i typologicky stejnými pannexiny (typ Px1), které jsou stejně jako konnexony schopny vylučovat ATP (Huang et al., 2007). P2X<sub>7</sub> receptor je neselektivní kanál pro malé kationty ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), který je při aktivaci schopen agregovat do podoby póru a umožňovat tak průnik molekul až do velikosti 600-800 Da, tedy i ATP (Sperlágh and Illes, 2014).

### Faktory ovlivňující aktivaci astrocytů a vylučování ATP

Na vylučování ATP má vliv mnoho faktorů, často spojené s patologickými podmínkami. V mnoha buňkách se iniciuje uvolňování ATP v odpovědi na stres jako hypoxie nebo ischemie (Sabirov and Okada, 2005).

Jedním z faktorů je regulace buněčného objemu v reakci na osmolaritu okolního prostoru buňky. Astrocyty zvětšují svůj objem v patologických podmínkách, proto by takto vyloučené ATP mohlo hrát roli právě v procesech s nimi spojenými. Bylo zjištěno, že jak v hypertonickém médiu, tak v hypotonickém médiu jsou oscilace  $Ca^{2+}$  závislé na ATP signalizaci narušené (Reetz et al., 1997). V hypoosmotickém prostředí vedoucí ke zvětšování objemu buňky dochází k vylučování ATP, které působí jako signální molekula zprostředkovávající otevření chloridových kanálů, jednu z buněčných odpovědí na zvětšující se objem buňky (Darby, 2002). Zvětšování objemu astrocyty se ukázalo být iniciačním faktorem pro vyloučení ATP i v případě  $Gd^{3+}$ -sensitive-maxi-anion kanálů (Liu et al., 2008).

Dalším faktorem je narušení iontové homeostáze. Mnohokrát byl prokázán vliv snížení  $[Ca^{2+}]_e$  (Coco et al., 2003; Suadicani, 2006). Arcuino et al. prokázal, že snížení  $[Ca^{2+}]_e$  vede k okamžitému vyloučení ATP nezávisle na fázi cyklu a úplné odstranění iontů chlórů a vápníku z extracelulárního prostoru vede ke zvýšení sekrece ATP až o tři řády (Arcuino et al., 2002). Otevírání konexonů je ovlivněno napětím na membráně (Kang et al., 2008) i vápenatými ionty (Cotrina et al., 1998) - otevírají se při snížení  $[Ca^{2+}]_e$  (Stout et al., 2002). U pannexinů je dokázáno otevírání při zvýšení  $[Ca^{2+}]_e$ .

Mechanický stres také může být sám o sobě indukčním faktorem pro uvolnění ATP (Coco et al., 2003; Liu et al., 2008; Ryu et al., 2010). Mechanická stimulace je dostačující pro zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ ; a tím aktivaci i Müllerových buněk v retině (Newman, 2003).

U astrocytů v prodloužené míše bylo prokázáno exocytotické vyloučení ATP při poklesu pH (Gourine et al., 2010). Uvolňování ATP může být stimulováno i mnoha molekulami jako Glu (Zhang et al., 2003), UTP (Cotrina et al., 1998), NO (Bal-Price et al., 2002) nebo NA (Kanno et al., 2010).

## Role astrocytů v SCN

Astrocyty SCN nejsou pouze podpůrné buňky pro přítomné neurony, stejně jako neurony SCN vykazují astrocyty denní rytmy v genové expresi svých hodinových genů (Prolo, 2005) a významnou měrou přispívají k celkovému charakteru cirkadiálních rytmů organismů. Jak bylo prokázáno u *Bmal1* astrocytů, jeho ztráta nebo mutace postihující expresi, prodlužuje periodu SCN neuronů a s tím i související lokomoční aktivitu (Tso et al., 2017). *Bmal1* astrocytů se podílí na koordinaci neurální sítě SCN skrze regulaci GABA signalizace (Barca-Mayo et al., 2017). Po knockdownu tohoto genu se snížil počet transportérů pro GABA na astrocytech, GAT1 a GAT3, a s tím se zvýšila koncentrace GABA v extracelulárním prostoru. Následkem byly změny v cirkadiální lokomoční aktivitě i v kognitivních funkcích (Barca-Mayo et al., 2017).

Rytmicita astrocytů se projevuje i fluktuací povrchového proteinu GFAP, jehož exprese vykazuje denní oscilace přetrvávající i v konstantní tmě (Monique and Servière, 1993). Na synchronizaci a udržení rytmicity astrocytů *in vitro* se podílí signalizace prostřednictvím VIP (Marpegan et al., 2009), která je ve stejné oblasti důležitá i pro neurony (Aton et al., 2005).

SCN astrocyty jsou na rozdíl od SCN neuronů aktivní během noci, což je významné pro regulaci aktivity neuronové sítě (Brancaccio et al., 2017). V dorzální části SCN dochází během noci ke zvyšování koncentrace Glu, který je z glií vylučován v závislosti na astrocytárních vápníkových vlnách. Glu se váže na NMDA receptory typu NR2C přítomných na neuronech a dochází k vylučování inhibičního neurotransmiteru GABA ze synaptických zakončení (Brancaccio et al., 2017), což má za následek hyperpolarizaci neuronů a tím tlumení jejich excitabilních schopností. Naopak během dne astrocyty aktivně Glu vychytávají prostřednictvím EAAT transportéru, u jehož typu EAAT3 byla v SCN zaznamenána cyklická exprese mRNA (Cagampang et al., 1996). Při aplikaci antagonisty NR2C došlo v dorzální části SCN k desynchronizaci, neurony jevíly narušené vápníkové oscilace, genovou expresi a zvýšení svého membránového potenciálu (Brancaccio et al., 2017). Role Glu, jakožto



kruciální molekuly podílející se na synchronizaci pacemakerových neuronů byla dokázána i u *Drosophily melanogaster* (Collins et al., 2014).

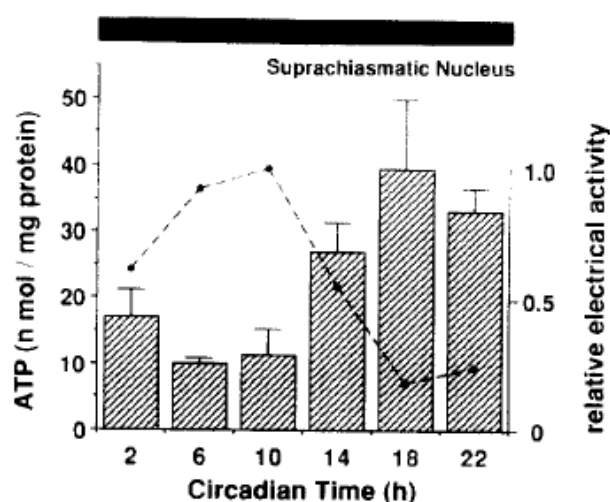
Astrocyty SCN jsou také schopny modulovat svou cirkadiánní aktivitu v odpovědi na TNF $\alpha$  a spolu s tím i modulovat expresi hodinových genů neuronů SCN (Duhart et al., 2013). Protože TNF $\alpha$  působí jako zánětlivý faktor, je možné, že astrocyty fungují jako prostředníky mezi imunitním systémem a systémem vnitřních hodin.

Význam glií na regulaci cirkadiánního chování a spánku byl prokázán i u *Drosophily melanogaster* (Ng et al., 2011). Genetické mutace postihující exocytický aparát, membránový potenciál a SERCA gen vedly k arytmitické lokomoční aktivitě, což naznačuje, jak kritickým faktorem je právě Ca<sup>2+</sup> dependentní exocytóza astrocytů v regulaci cirkadiánního chování u *Drosophily*. Mutace astrocytů octomilky také vedla k poruchám v syntéze a uvolňování PDF, neuropeptidu analogickému savčímu VIP, který je esenciální pro synchronizaci neurální sítě a rytmicitu chování *Drosophily* (Ng et al., 2011). Dalším příkladem je, že narušení exprese enzymu Ebony, jehož množství vykazuje v gliích *Drosophily* cirkadiánní změny, bylo doprovázeno i změnami v behaviorálních rytmech *Drosophily* (Suh and Jackson, 2007).

Astrocyty s neurony jsou tedy rovnocennými partnery v udržování cirkadiánní rytmicity a řízení cirkadiánního chování ve zbytku těla (Brancaccio et al., 2017). Komunikace mezi astrocyty a neurony je významná pro správnou organizaci vnitřních hodin (Barca-Mayo et al., 2017).

## Rytmické uvolňování ATP z astrocytů

V suprachiasmatickém jádře dochází k cyklům v koncentraci extracelulárního ATP, ovšem jejich role je nejasná. Hladina této molekuly v extracelulárním prostoru se periodicky mění, přičemž její celková hodnota je v SCN více jak čtyřikrát vyšší v porovnání s jinými oblastmi mozku (Yamazaki et al., 1994). Chemiluminiscenční analýza prokázala, že koncentrace extracelulárního ATP fluktuuje s periodou 24 hodin, přičemž největší koncentrace dosahuje uprostřed subjektivní noci, tedy negativně



Obr. 8: Srovnání koncentrace ATP a elektrické aktivity SCN. V grafu jsou sloupcovitě znázorněny cirkadiánní změny v hladině ATP, ty jsou v protifázi k elektrické aktivitě, která je znázorněna přerušovanou čarou. (Upraveno dle Yamazaki et al., 1994)

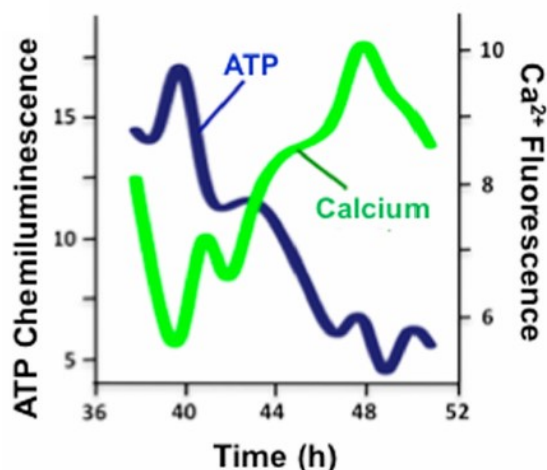


koreluje s elektrickou a metabolickou aktivitou SCN (Womac et al., 2009).

ATP je vylučováno astrocyty, které toho jsou schopny i v kulturách *in vitro*, bez přítomnosti vnějších signálů od neuronů (Womac et al., 2009). Mechanismus rytmicky vylučovaného ATP z astrocytů v SCN je neznámý, byla ovšem vyloučena SNARE exocytóza (Marpegan et al., 2011). Cyklické vylučování ATP je závislé na hodinových genech *Clock*, *Per1* a *Per2* (Marpegan et al., 2011) a funkční IP<sub>3</sub> dependentní dráze, která zajišťuje uvolňování Ca<sup>2+</sup> z ER.

Závislost ATP cyklů na vápníku byla potvrzena i studií provedenou Burkeen *et al.*, která zjistila souvislost s vápníkovými oscilacemi v mitochondriích. Ty jsou v antifázi s oscilacemi v cytosolu a zároveň přímo úměrné hladině extracelulárního ATP (Burkeen et al., 2011). Při inhibici mitochondriálního Ca<sup>2+</sup> uniporteru Ru360 došlo ke značnému poklesu v extracelulární hladině ATP, což podporuje významnost mitochondriálních vápníkových zásob na regulaci vylučování ATP (Burkeen et al., 2011). Přímá korelace mezi hladinou mitochondriálního vápníku a hladinou extracelulárního ATP ovšem také může pouze odrážet skutečnost, že množství mitochondriálního vápníku přímo souvisí s rychlostí oxidativního metabolismu a ATP syntézou (Wiederkehr et al., 2011), např. u astrocytů CA1 oblasti hipokampu došlo k blokaci vylučování ATP při inhibici jejich oxidativního metabolismu fluoroacetátem (Heinrich et al., 2012).

V suprachiasmatickém jádře jsou převážně homogenně zastoupeny jak receptory typu P2X, tak P2Y (Bhattacharya et al., 2013). Množství exprese jejich mRNA představuje pořadí: P2Y<sub>1</sub>>P2Y<sub>14</sub>>P2Y<sub>12</sub>>P2X<sub>7</sub>>P2Y<sub>13</sub>>P2X<sub>3</sub>>P2X<sub>4</sub>>P2X<sub>2</sub>=P2Y<sub>4</sub>>P2X<sub>5</sub>=P2Y<sub>6</sub>>P2X<sub>1</sub>>P2X<sub>6</sub>=P2Y<sub>2</sub>. Sedm z těchto receptorů - P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>14</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>1</sub> - vykazuje cyklické změny ve svém množství v závislosti na fázi cirkadiálního rytmu (Lommen et al., 2017). Zastoupení receptorů P2X a P2Y je ve vzájemné antifázi, přestože jejich exprese probíhá totožně v pozdní světelné a ranní temnostní fázi, což znamená, že variace v množství jednotlivých P2 receptorů nereflktuje transkripci (Lommen et al., 2017).



Obr. 9: Graf znázorňující vztah mezi extracelulární koncentrací ATP a koncentrací vápníku v mitochondriích. Osa nalevo představuje hladinu extracelulárního ATP získanou na základě chemiluminiscenční analýzy, osa napravo koncentraci mitochondriálního vápníku změřenou díky fluorescenčnímu barvivu. Na grafu je vidět inverzní charakter těchto dvou rytmů. (Upraveno dle Burkeen et al., 2011)

Bylo zjištěno, že se ATP váže na P2X<sub>2</sub> receptory presynaptických neuronů a pravděpodobně iniciací vstupu Ca<sup>2+</sup> do buňky zvyšuje frekvenci výlevu inhibičního neurotransmiteru GABA (Bhattacharya et al., 2013), což vyúsťuje v tlumení aktivity neurální sítě. P2X<sub>4</sub> receptor je hojně zastoupen v *core* během temnostní fáze, což by mohlo souviset se schopností jádra se synchronizovat s vnějšími světelnými podmínkami (Lommen et al., 2017). V oblasti *chiasma opticum* a *core* SCN je přítomen také P2Y<sub>13</sub> (Lommen et al., 2017).

Lommen *et al.* ze svých závěrů vyvozuje, že purinergní signalizace se podílí na modulaci neurotransmise v retinohypotalamickém traktu, což je podporováno i dřívější studií GABAergního synaptického přenosu v SCN (Bhattacharya et al., 2013).

Aktivace P2X receptorů je spojena s trofickým účinkem na astrocyty během astrogliózy, kdy vlivem zvýšené extracelulární koncentrace ATP dochází k prodlužování astrocytárních výběžků (Neary et al., 1996). Také SCN vykazuje cirkadiánní změny ve své ultrastruktuře, které jsou spojeny právě se změnou v rozmístění astrocytárních výběžků na jednotlivých částech AVP a VIP neuronů (Becquet et al., 2008). Během noci je zvýšené pokrytí dendritů VIP a naopak snížené u jejich somat, u AVP neuronů to platí opačně. Jiná teorie související s periodickými změnami koncentrace ATP by mohla být spojena s regulací spánkových procesů, kde hraje významnou roli katabolický produkt ATP, adenosin. Podobně je tomu v *pars basalis telencephali*, kde adenosin fascilituje uvolňování GABA a iniciuje tak spánek (Wulff et al., 2010). Adenosin může být fosforylován na AMP, které aktivuje AMPK, jeden z hlavních buněčných regulátorů metabolismu podílející se na přijímání glukózy a oxidaci mastných kyselin. Spánková deprivace vede ke zvýšení hladiny tohoto enzymu a tím dochází ke stimulaci anabolických procesů. Mění se hladina ATP během spánku by proto mohla ovlivňovat i buněčné metabolické pochody (Masri and Sassone-Corsi, 2013).

## Závěr

Purinergní signalizace je masivně rozšířený způsob komunikace regulující procesy od vaskulárního tonu, zánětlivé odpovědi až po přenos bolesti. Jako neurotransmitter působí ATP jak v periferní, tak v centrální nervové soustavě a je také jednou z hlavních signálních molekul vylučovaných astrocyty, které se podílejí na jejich komunikaci s neurony.

Astrocyty vylučují ATP prostřednictvím řady mechanismů zahrnující exocytózu, ABC transportéry a množství různých kanálů. Takto uvolněné ATP pak dále působí přímo nebo nepřímo prostřednictvím štěpného produktu adenosinu na řadu purinergních receptorů přítomných na neuronech. Jak ATP tak adenosin jsou schopny modulovat neurální excitabilitu neuronů. Astrocyty také využívají ATP jako komunikačního prostředku, díky němuž se mezi astrocytární populací šíří vápníkové vlny. Tyto změny v cytosolické koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  doprovází aktivaci astrocytu, která ve výsledku může vést k vylučování gliotransmiterů či metabolickým změnám, takže ve výsledku funguje populace astrocytů jako synchronizovaná jednotka.

V suprachiasmatickém jádru dochází v pravidelných denních cyklech ke kumulaci extracelulárního ATP, které je vlivem vápníkové signalizace vylučováno astrocyty. Není přesně jasné, jakým způsobem je ATP uvolňováno, ale velkou roli hraje  $\text{IP}_3$  dependentní dráha uvolňující vápník z endoplazmatického retikula a také hladina vápníku v mitochondriích, která s hladinou extracelulárního ATP pozitivně koreluje. O významu těchto ATP fluktuací se stále debatuje, ovšem rozšíření purinergních receptorů v SCN naznačuje nejpravděpodobnější signální význam ATP v této oblasti. To podporuje také studie Bhattacharya *et al.* prokazující stimulační roli ATP v procesu vylučování GABA z přítomných neuronů a tím potencující tlumení neurální sítě v suprachiasmatickém jádru během temnostní fáze cyklu. Vzhledem k tomu, že vylučování ATP, které je závislé na hodinových genech, se zvyšuje během specifické fáze cirkadiánního cyklu a také zastoupení některých purinergních receptorů se v SCN periodicky mění, je možno usuzovat, že ATP se jako signální molekula podílí na řízení cirkadiánní fyziologie suprachiasmatického jádra. Přesná funkce tohoto mechanismus ovšem stále čeká na objasnění.

## Reference

- Abbracchio, M., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *TRENDS Neurosci.* 32, 19–29.
- Adachi, A., Natesan, A., Whitfield-Rucker, M., Weigum, S., and Cassone, V. (2002). Functional melatonin receptors and metabolic coupling in cultured chick astrocytes. *GLIA* 39, 268–278.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol. CB* 15, 886–893.
- Allen, N.J. (2013). Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1027–1033.
- Anderson, C.M., Bergher, J.P., and Swanson, R.A. (2004). ATP-induced ATP release from astrocytes. *J. Neurochem.* 88, 246–256.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Arcuino, G., Lin, J.H.-C., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J., and Nedergaard, M. (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9840–9845.
- Arne eSchousboe, Lasse Kristoffer Bak, and Helle S nderby Waagepetersen (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and Gaba. *Front. Endocrinol.* Vol 4 2013.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 476–483.
- Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003). Review: Glial Cells and Neurotransmission. An Inclusive View of Synaptic Function. *Neuron* 40, 389–400.
- Ballerini, P., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Nargi, E., D’Alimonte, I., Traversa, U., Rathbone, M., and Caciagli, F. (2002). Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *NEUROREPORT* 13, 1789–1792.
- Bal-Price, A., Moneer, Z., and Brown, G.C. (2002). Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40, 312–323.
- Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., and De Pietri Tonelli, D. (2017). Astrocyte deletion of Bmal1 alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nat. Commun.* 8.
- Beaulé, C., Swannstrom, A., Leone, M.J., and Herzog, E.D. (2009). Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PLoS One* 4, e7476.

- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., François-Bellan, A.-M., and Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294–305.
- Bell, P.D., Lapointe, J.-Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K.-I., Kovacs, G., and Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4322–4327.
- Ben Achour, S., and Pascual, O. (2012). Astrocyte-Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochem. Res.* 37, 2464–2473.
- Bhattacharya, A., Vavra, V., Svobodova, I., Bendova, Z., Vereb, G., and Zemkova, H. (2013). Potentiation of Inhibitory Synaptic Transmission by Extracellular ATP in Rat Suprachiasmatic Nuclei. *J. Neurosci.* 33, 8035–+.
- Bowser, D., and Khakh, B. (2004). ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J. Neurosci.* 24, 8606–8620.
- Brancaccio, M., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Loudon, A.S.I., and Hastings, M.H. (2013). A Gq-Ca<sup>2+</sup> axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 78, 714–728.
- Brancaccio, M., Patton, A.P., Chesham, J.E., Maywood, E.S., and Hastings, M.H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93, 1420–1435.e5.
- Brancaccio, M.( 1 ), Enoki, R.( 2 ), Mazuski, C. n. ( 3 ), Jones, J.( 4 ), Evans, J. a. ( 5 ), and Azzi, A.( 6 ) (2014). Network-mediated encoding of circadian time: The suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. *J. Neurosci.* 34, 15192–15199.
- Burkeen, J.F., Womac, A.D., Earnest, D.J., and Zoran, M.J. (2011). Mitochondrial Calcium Signaling Mediates Rhythmic Extracellular ATP Accumulation in Suprachiasmatic Nucleus Astrocytes. *J. Neurosci.* 31, 8432–8440.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic Nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–581.
- Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166–176.
- Burnstock, G. (2009). Purinergic signalling: past, present and future. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 42, 3–8.
- Cagampang, F.R., Rattray, M., Powell, J.F., Chong, N.W., Campbell, I.C., and Coen, C.W. (1996). Circadian variation of EAAC1 glutamate transporter messenger RNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 35, 190–196.
- Cao, X., Li, L., Wang, Q., Wu, Q., Hu, H., Zhang, M., Fang, Y., Zhang, J., Li, S., Xiong, W., et al. (2013). Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat. Med.* 19, 773–+.
- Chen, J., Tan, Z., Zeng, L., Zhang, X., He, Y., Gao, W., Wu, X., Li, Y., Bu, B., Wang, W., et al. (2013). Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *GLIA* 61, 178–191.
- Chi-Castañeda, D., and Ortega, A. (2016). Clock Genes in Glia Cells: A Rhythmic History. *ASN Neuro* 8.

Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., and Verderio, C. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 278, 1354–1362.

Collins, B., Kaplan, H., Cavey, M., Lelito, K., Bahle, A., Zhu, Z., Macara, A., Roman, G., Shafer, O., and Blau, J. (2014). Differentially Timed Extracellular Signals Synchronize Pacemaker Neuron Clocks. *PLOS Biol.* 12.

Colwell, C. (2005). Bridging the gap: coupling single-cell oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 8, 10–12.

Colwell, C.S. (2000). Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 12, 571–576.

Corriden, R., and Insel, P.A. (2010). Basal Release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation. *Sci. Signal.* 3, re1-re1.

Cotrina, M.L., Lin, J.H.-C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C.G., and Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15735–15740.

Darby, M. (2002). ATP Released From Astrocytes During Swelling Activates Chloride Channels. *J. Neurophysiol.* 89, 1870–1877.

Davalos, D., Grutzendler, J., Guang Yang, Kim, J.V., Yi Zuo, Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Doi, M., Ishida, A., Miyake, A., Sato, M., Komatsu, R., Yamazaki, F., Kimura, I., Tsuchiya, S., Kori, H., Seo, K., et al. (2011). Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.* 2, ncomms1316.

Duhart, J. m. ( 1 ), Leone, M. j. ( 1 ), Paladino, N.( 1 ), Golombek, D. a. ( 1 ), Evans, J. a. ( 2 ), Castanon-Cervantes, O.( 2 ), and Davidson, A. j. ( 2 ) (2013). Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 191, 4656–4664.

Dworak, M., McCarley, R., Kim, T., Kalinchuk, A., and Basheer, R. (2010). Sleep and Brain Energy Levels: ATP Changes during Sleep. *J. Neurosci.* 30, 9007–9016.

Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Article: Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 43, 729–743.

Ferreira-Neto, H.C., Yao, S.T., and Antunes, V.R. (2013). Purinergic and glutamatergic interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow. *Purinergic Signal.* 9, 337–349.

Fiacco, T., and McCarthy, K. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 24, 722–732.

Franke, H., and Illes, P. (2014). Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neurosci. Lett.* 565, 14–22.

- Fukada, Y., and Okano, T. (2002). Circadian clock system in the pineal gland. *Mol. Neurobiol.* 25, 19–30.
- Gerevich, Z., and Illes, P. (2004). P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal.* 1, 3–10.
- Golovina, V. (2005). Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.-Lond.* 564, 737–749.
- Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–575.
- Grosse, J., and Davis, F.C. (1998). Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 8032–8037.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 520–528.
- Gwinner, E., Hau, M., and Heigl, S. (1997). Melatonin: Generation and modulation of avian circadian rhythms. *Brain Res. Bull.* 44, 439–444.
- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.-Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213–219.
- Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238.
- Hamilton, N., Vayro, S., Wigley, R., and Butt, A. m. (2010). Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia. *GLIA* 58, 66–79.
- Haydon, P.G. (2001). Glia: Listening and Talking to the Synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193.
- Heinrich, A., Andó, R., Túri, G., Rózsa, B., and Sperlág, B. (2012). K<sup>+</sup> depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br. J. Pharmacol.* 167, 1003–1020.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.
- Herzog, E.D., Takahashi, J.S., and Block, G.D. (1998). Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 708.
- Herzog, E.D., Hermansteyne, T., Smyllie, N.J., and Hastings, M.H. (2017). Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a027706.
- Hösli, E., and Hösli, L. (2000). Colocalization of neurotransmitter receptors on astrocytes in explant cultures of rat CNS. *Neurochem. Int.* 36, 301–311.

- Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6436–6441.
- Hunt, A.E., Al-Ghoul, W.M., Gillette, M.U., and Dubocovich, M.L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *280*, C110-118.
- Idzko, M., Ferrari, D., and Eltzschig, H. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *NATURE* *509*, 310–317.
- Ishii, K., Hirose, K., and Iino, M. (2006). Ca<sup>2+</sup> shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO Rep.* *7*, 390–396.
- JACKSON, F.R. (2011). Glial Cell Modulation of Circadian Rhythms. *Glia* *59*, 1341–1350.
- Jo, Y.-H., and Role, L.W. (2002). Coordinate Release of ATP and GABA at In Vitro Synapses of Lateral Hypothalamic Neurons. *J. Neurosci.* *22*, 4794–4804.
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 4702–4711.
- Kanno, T., Yaguchi, T., and Nishizaki, T. (2010). Noradrenaline stimulates ATP release from DRG neurons by targeting beta(3) adrenoceptors as a factor of neuropathic pain. *J. Cell. Physiol.* *224*, 345–351.
- Kazuki eHarada, Taichi eKamiya, and Takashi eTsuboi (2016). Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental and pathological implications in the brain. *Front. Neurosci.* Vol 9 2016.
- Khakh, B., Gittermann, D., Cockayne, D., and Jones, A. (2003). ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J. Neurosci.* *23*, 7426–7437.
- KOFUJI, P., and NEWMAN, E.A. (2004). POTASSIUM BUFFERING IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Neuroscience* *129*, 1045–1056.
- Koizumi, S. (2010). Synchronization of Ca<sup>2+</sup> oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J.* *277*, 286–292.
- Kuo-Jung Lo, S., Hsiang-Ning Luk, Ting-Yu Chin, and Sheau-Huei Chueh (2002). Store depletion-induced calcium influx in rat cerebellar astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* *135*, 1383–1392.
- Lalo, U., Rasooli-Nejad, S., and Pankratov, Y. (2014a). Exocytosis of gliotransmitters from cortical astrocytes: implications for synaptic plasticity and aging. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1275–1281.
- Lalo, U.( 1 ), Palygin, O.( 2 ), Rasooli-Nejad, S.( 2 ), Andrew, J.( 2 ), Pankratov, Y.( 2 ), and Haydon, P. g. ( 3 ) (2014b). Exocytosis of ATP From Astrocytes Modulates Phasic and Tonic Inhibition in the Neocortex. *PLoS Biol.* *12*.
- Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., and Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12915–12919.



Le Feuvre, R., Brough, D., and Rothwell, N. (2002). Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 261–269.

Lee, I.T., Chang, A.S., Manandhar, M., Shan, Y., Fan, J., Izumo, M., Ikeda, Y., Motoike, T., Dixon, S., Seinfeld, J.E., et al. (2015). Neuromedin s-producing neurons act as essential pacemakers in the suprachiasmatic nucleus to couple clock neurons and dictate circadian rhythms. *Neuron* 85, 1086–1102.

Leybaert, L., and Sanderson, M.J. (2012). INTERCELLULAR Ca<sup>2+</sup> WAVES: MECHANISMS AND FUNCTION. *Physiol. Rev.* 92, 1359.

Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C., and Oheim, M. (2008). Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7648–7658.

Lin, J.H.-C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2007). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.* 302, 356–366.

Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Buhr, E.D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I.M., et al. (2007). Interacellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 129, 605–616.

Liu, C. (1), Weaver, D. r. (1), Jin, X. (1), Shearman, L. p. (1), Reppert, S. m. (1), Pieschl, R. I. (2), and Gribkoff, V. k. (2) (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102.

Liu, H., Toychiev, A., Takahashi, N., Sabirov, R., and Okada, Y. (2008). Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *CELL Res.* 18, 558–565.

Liu, T., Sun, L., Xiong, Y., Shang, S., Guo, N., Teng, S., Wang, Y., Liu, B., Wang, C., Wang, L., et al. (2011). Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10593–10601.

Lohman, A.W., Billaud, M., and Isakson, B.E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 95, 269–280.

Lommen, J., Stahr, A., Ingenwerth, M., Ali, A.A.H., and von Gall, C. (2017). Time-of-day-dependent expression of purinergic receptors in mouse suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.*

Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N.A., Schnermann, J., Tieu, K., and Nedergaard, M. (2012). Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6265–6270.

Lundkvist, G.B., Kwak, Y., Davis, E.K., Tei, H., and Block, G.D. (2005). A Calcium Flux Is Required for Circadian Rhythm Generation in Mammalian Pacemaker Neurons. *J. Neurosci.* 25, 7682–7686.

Marpegan, L., Krall, T.J., and Herzog, E.D. (2009). Vasoactive intestinal polypeptide entrains circadian rhythms in astrocytes. *J. Biol. Rhythms* 24, 135–143.

Marpegan, L., Swannstrom, A.E., Chung, K., Simon, T., Haydon, P.G., Khan, S.K., Liu, A.C., Herzog, E.D., and Beaule, C. (2011). Circadian Regulation of ATP Release in Astrocytes. *J. Neurosci.* 31, 8342–8350.

Masri, S., and Sassone-Corsi, P. (2013). The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 69–75.

Mieda, M.( 1 ), Sakurai, T.( 1 ), and Okamoto, H.( 2 ) (2016). Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. *Curr. Biol.* 26, 2535–2542.

Monique, L., and Servière, J. (1993). Circadian fluctuations in GFAP distribution in the syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport* 4, 1243–1246.

Moore, R.Y. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu. Rev. Med.* 48, 253–266.

Morin, L.P., Johnson, R.F., and Moore, R.Y. (1989). Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci. Lett.* 99, 55–60.

Nahm, S.-S., Farnell, Y.Z., Griffith, W., and Earnest, D.J. (2005). Circadian regulation and function of voltage-dependent calcium channels in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 9304–9308.

Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 19, 13–18.

Newman, E. (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J. Neurosci.* 21, 2215–2223.

Newman, E. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* 23, 1659–1666.

Newman, E.A. (2005). Calcium Increases in Retinal Glial Cells Evoked by Light-Induced Neuronal Activity. *J. Neurosci.* 25, 5502–5510.

Newman, E.A., and Zahs, K.R. (1997). Calcium Waves in Retinal Glial Cells. *Science* 844.

Newman, E.A., and Zahs, K.R. (1998). Modulation of Neuronal Activity by Glial Cells in the Retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 4022–4028.

Ng, F.S., Tangredi, M.M., and Jackson, F.R. (2011). Glial Cells Physiologically Modulate Clock Neurons and Circadian Behavior in a Calcium-Dependent Manner. *Curr. Biol.* 21, 625–634.

O'Neill, J.S., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Takahashi, J.S., and Hastings, M.H. (2008). cAMP-Dependent Signaling as a Core Component of the Mammalian Circadian Pacemaker. *Science* 320, 949–953.

Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775–784.

Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146, 785–798.

Pangrsic, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E., Khiroug, L., Giniatullin, R., and Zorec, R. (2007). Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 28749–28758.

- Parnis, J.( 1 ), Delgado-Martinez, I.( 1, 5,6 ), Matyash, V.( 1 ), Kettenmann, H.( 1 ), Nolte, C.( 1 ), Sekler, I.( 2 ), Montana, V.( 3 ), and Parpura, V.( 3, 4 ) (2013). Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role in the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. *J. Neurosci.* 33, 7206–7219.
- Parpura, V., and Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* 63, 83–92.
- Parpura, V.( 1, 2 ), Basarsky, T. a. ( 1, 2 ), Haydon, P. g. ( 1, 2 ), Liu, F.( 2, 3 ), Jeftinija, K.( 2, 3 ), and Jeftinija, S.( 2, 3 ) (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Parri, H.R., Gould, T.M., and Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* 4, 803.
- Pascual, O. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310, 113–116.
- Peters, J., Cassone, V., and Zoran, M. (2005a). Melatonin modulates intercellular communication among cultured chick astrocytes. *BRAIN Res.* 1031, 10–19.
- Peters, J.L., Earnest, B.J., Tjalkens, R.B., Cassone, V.M., and Zoran, M.J. (2005b). Modulation of intercellular calcium signaling by melatonin in avian and mammalian astrocytes is brain region-specific. *J. Comp. Neurol.* 493, 370–380.
- Petravicz, J., Fiacco, T., and McCarthy, K. (2008). Loss of IP3R-Dependent Ca<sup>2+</sup> Increases in Hippocampal Astrocytes Does Not Affect Baseline CA1 Pyramidal Neuron Synaptic Activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4967–4973.
- Peuchen, S.( 1 ), Clark, J. b. ( 1 ), and Duchen, M. r. ( 2 ) (1996). Mechanisms of intracellular calcium regulation in adult astrocytes. *Neuroscience* 71, 871–883.
- Pevet, P., and Challet, E. (2011). Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol. Paris* 105, 170–182.
- Pitts, G. r., Ohta, H., and McMahon, D. g. (2006). Daily rhythmicity of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 1071, 54–62.
- Porter, J. t. ( 1 ), and McCarthy, K. d. ( 1, 2 ) (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073–5081.
- Prolo, L.M. (2005). Circadian Rhythm Generation and Entrainment in Astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 404–408.
- del Puerto, A., Fronzaroli-Molinieres, L., Perez-Alvarez, M.J., Giraud, P., Carlier, E., Wandosell, F., Debanne, D., and Garrido, J.J. (2015). ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury. *Cereb. Cortex* 25, 2282–2294.
- Quintero, J.E., Kuhlman, S.J., and McMahon, D.G. (2003). The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8070–8076.
- Reetz, G.( 1, 2,3 ), Reiser, G.( 1, 4 ), and Wiesinger, H.( 2 ) (1997). ATP-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> activity in cultured astrocytes from rat brain are modulated by medium osmolarity indicating a control of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations by cell volume. *Neurochem. Res.* 22, 621–628.

- Reyes, R.C., and Parpura, V. (2008). Mitochondria modulate Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release from rat cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9682–9691.
- Rumjahn, S.M., Yokdang, N., Baldwin, K.A., Thai, J., and Buxton, I.L.O. (2009). Purinergic regulation of vascular endothelial growth factor signaling in angiogenesis. *Br. J. Cancer* 100, 1465–1470.
- Ryu, J., Choi, H., Hatori, K., Heisel, R., Pelech, S., McLarnon, J., and Kim, S. (2003). Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J. Neurosci. Res.* 72, 352–362.
- Ryu, S.-Y., Peixoto, P.M., Won, J.H., Yule, D.I., and Kinnally, K.W. (2010). Extracellular ATP and P2Y2 receptors mediate intercellular Ca(2+) waves induced by mechanical stimulation in submandibular gland cells: Role of mitochondrial regulation of store operated Ca(2+) entry. *Cell Calcium* 47, 65–76.
- Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2005). ATP release via anion channels. *Purinergic Signal.* 1, 311–328.
- Sabirov, R.Z., Dutta, A.K., and Okada, Y. (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* 118, 251–266.
- Sahlender, D., Savtchouk, I., and Volterra, A. (2014). What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 369.
- Schell, M.J., Molliver, M.E., and Snyder, S.H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3948–3952.
- Sebastião, A. m. ( 1 ), Ribeiro, J. a. ( 1 ), and Cunha, R. a. ( 2, 3 ) (1998). Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J. Neurosci.* 18, 1987–1995.
- Shigetomi, E., Bowser, D.N., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2008). Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6659–6663.
- Shirakawa, T., Honma, S., Katsuno, Y., Oguchi, H., and Honma, K.I. (2000). Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2833–2838.
- Shuboni, D.D., Agha, A.A., Groves, T.K.H., and Gall, A.J. (2016). The contribution of the pineal gland on daily rhythms and masking in diurnal grass rats, *Arvicanthis niloticus*. *Behav. Processes* 128, 1–8.
- Simpson, P.B., and Russell, J.T. (1998). Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 72–81.
- Souza-Teodoro, L.H., Dargenio-Garcia, L., Petrilli-Lapa, C.L., Souza, E. da S., Fernandes, P.A.C.M., Markus, R.P., and Ferreira, Z.S. (2016). Adenosine triphosphate inhibits melatonin synthesis in the rat pineal gland. *J. Pineal Res.* 60, 242–249.
- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M.C., Lascorz, J., Depner, M., Holzberg, D., Soyka, M., et al. (2005). The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat. Med.* 11, 35–42.

- Sperlágh, B., and Illes, P. (2014). P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 537–547.
- Stehle, J.H., von Gall, C., and Korf, H.-W. (2003). Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J. Neuroendocrinol.* 15, 383–389.
- Stephen, T.-L., Gupta-Agarwal, S., and Kittler, J.T. (2014). Mitochondrial dynamics in astrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1302–1310.
- Stout, C., Costantin, J., Naus, C., and Charles, A. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488.
- Strecker, G.J., Wuarin, J.-P., and Dudek, F.E. (1997). GABAA-Mediated Local Synaptic Pathways Connect Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurophysiol.* 78, 2217–2220.
- Striedinger, K., Meda, P., and Scemes, E. (2007). Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillations and cell migration. *GLIA* 55, 652–662.
- Suadcani, S.O. (2006). P2X7 Receptors Mediate ATP Release and Amplification of Astrocytic Intercellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *J. Neurosci.* 26, 1378–1385.
- Suh, J., and Jackson, F.R. (2007). *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* 55, 435–447.
- Takahashi, J.S., Hong, H.-K., Ko, C.H., and McDearmon, E.L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775.
- Tan, Z., Liu, Y., Xi, W., Lou, H., Zhu, L., Guo, Z., Mei, L., and Duan, S. (2017). Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons. *Nat. Commun.* 8.
- Traut, T.W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* 140, 1–22.
- Tso, C. f. ( 1 ), Simon, T.( 1 ), Greenlaw, A. c. ( 1 ), Puri, T.( 1 ), Herzog, E. d. ( 1 ), and Mieda, M.( 2 ) (2017). Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Curr. Biol.* 27, 1055–1061.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043–1045.
- Vacas, M.I., Sarmiento, M.I.K., Pereyra, E.N., Etchegoyen, G.S., and Cardinali, D.P. (1987). In vitro effect of neuropeptide Y on melatonin and norepinephrine release in rat pineal gland. *Cell. Mol. Neurobiol.* 7, 309–315.
- Verkhatsky, A., Rodriguez, J., and Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 45–56.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.

Welsh, D. k. ( 1, 2 ), Reppert, S. m. ( 1, 2 ), Meister, M.( 2, 4 ), and Logothetis, D. e. ( 3 ) (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706.

Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Matak, C., Heizmann, C.W., Schoonjans, K., Pozzan, T., Spät, A., and Wollheim, C.B. (2011). Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab.* 13, 601–611.

Womac, A.D., Burkeen, J.F., Neuendorff, N., Earnest, D.J., and Zoran, M.J. (2009). Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 30, 869–876.

Wulff, K., Gatti, S., Wettstein, J.G., and Foster, R.G. (2010). Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 589–599.

Yamazaki, S., Ishida, Y., and Inouye, S. (1994). Circadian rhythms of adenosine triphosphate contents in the suprachiasmatic nucleus, anterior hypothalamic area and caudate putamen of the rat--negative correlation with electrical activity. *Brain Res.* 664, 237–240.

Yu Chen, Ross Corriden, Yoshiaki Inoue, Linda Yip, Naoyuki Hashiguchi, Annelies Zinkernagel, Victor Nizet, Paul A. Insel, and Wolfgang G. Junger (2006). ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science* 1792.

Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971–982.

Zhijun Zhang, Gang Chen, Wei Zhou, Aihong Song, Tao Xu, Qingming Luo, Wei Wang, Xiao-song Gu, and Shumin Duan (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953.

Hung, L.-M., and Chen T.-H. (2003). Circadian Rhythm of ATP Contents in *Synechococcus* RF-1. *Bio Formosa* 38, 1–5.